

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Marcadores de velocidad de envejecimiento y predictores de
longevidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Martínez de Toda Cabeza

Directora

Mónica de la Fuente del Rey

Madrid

© Irene Martínez de Toda Cabeza, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MARCADORES DE VELOCIDAD
DE ENVEJECIMIENTO Y PREDICTORES
DE LONGEVIDAD**

TESIS DOCTORAL

IRENE MARTÍNEZ DE TODA CABEZA

Directora: Mónica De La Fuente Del Rey

Madrid 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20____

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY, Catedrática de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**MARCADORES DE VELOCIDAD DE ENVEJECIMIENTO Y PREDICTORES DE LONGEVIDAD**”, realizada por IRENE MARTÍNEZ DE TODA CABEZA, bajo su dirección y supervisión, para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 10 de junio de 2019

VºBº del director de Tesis

Dra. Mónica de la Fuente del Rey

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos BFU2011-30336 del actual Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), PI15/01787 del Fondo de Investigación en Salud (FIS) del ISCIII-FEDER de la Unión Europea, de la Red de Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD 12/0043/0018) del Instituto de Salud Carlos III, del grupo UCM-CM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN) (Nº 910379) y con la concesión a Irene Martínez de Toda Cabeza de un Contrato predoctoral de Personal Investigador en Formación de la Universidad Complutense de Madrid.

*“La ciencia tiene una característica maravillosa,
y es que aprende de sus errores.”*

Rudolf Virchow

AGRADECIMIENTOS

No encuentro las palabras adecuadas para poder expresar con exactitud lo feliz que me siento llegado este momento. Sin duda, el realizar una tesis doctoral es el compromiso más grande al que nunca me he enfrentado. Durante estos cinco años, esta tesis (y todo lo que le rodea) ha sido una parte fundamental en mi vida, una entrega constante, de esfuerzo y dedicación, una carrera de fondo en la que ya me encuentro muy cerca de cruzar la meta.

En realidad, siempre me atrajo mucho la idea de realizar una tesis doctoral. Sin embargo, tenía que encontrar un tema que me motivase lo suficiente como para embarcarme en tal aventura. Mi pasión por la investigación comenzó cuando me fui de Erasmus a Dinamarca en 5º curso de la Licenciatura en Bioquímica. Tenía que “cumplir” unas horas de colaboración en algún grupo de investigación para que me las convalidasen por los créditos del proyecto de fin de carrera. Así pues, empecé a investigar los grupos de investigación que había en Aarhus University, y llegué a la página web de un IP, el profesor **Suresh Rattan**, el cual investigaba el proceso de envejecimiento. A través de su página web, pude intuir que este investigador se salía un poco de la “norma” del estereotipo de científico, hecho que me llamó mucho la atención. Le escribí un email y me dijo que me pasase por su despacho. Ahí estaba yo, lo recuerdo como si fuese ayer, nerviosa con mi limitada capacidad de expresión en inglés, esperando ante su despacho para entrar. Me invitó a pasar muy sonriente, me senté en la silla enfrente de él y me hizo la siguiente pregunta: “What is health?”. A pesar de que puede parecer una pregunta relativamente simple, fui incapaz de contestar nada. Tras unos minutos de bloqueo me hizo otra pregunta: “What things can we measure to define health?” Mis neuronas intentaban encontrar una respuesta que me hiciese demostrarle que no era tonta, pero infructíferamente. Entonces me dijo que reflexionase acerca de esos conceptos y que volviese en una semana a discutirlos con él. Desde ese momento y hasta el día de hoy, el tema de la salud y el envejecimiento han ocupado mi mente todos los días. A pesar de estar a punto de concluir la tesis, aún no tengo una respuesta categórica para ninguna de las dos preguntas.

Durante los diez meses que estuve en el “Laboratory of Cellular Ageing”, aprendí lo que suponía investigar. El doctor **Dino Demirovic** me enseñó infinidad de técnicas experimentales y empecé a llevar a cabo mi propio proyecto de investigación. Muchísimo más de lo que jamás hubiese podido desear. Ahí fue cuando empezó mi pasión por las vías moleculares de respuesta al estrés, como elementos clave en el mantenimiento de la salud y en el proceso de envejecimiento. Ellos fueron sin duda, los impulsores de mi pasión por la investigación.

Tras el año en Dinamarca, regresé a España para cursar el Máster de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina en la Complutense. En este punto, tenía que encontrar un laboratorio donde poder llevar a cabo mi proyecto de final de máster. Salieron publicadas una serie de ofertas en distintos grupos de investigación adscritos a dicho máster. La mayoría consistían en trabajos muy “bioquímicos” de cambio de un aminoácido por otro para estudiar la función, estructura y propiedades de una determinada proteína. Aunque eran grupos de investigación muy buenos, yo quería seguir profundizando en el tema del envejecimiento. Fue entonces cuando encontré a la catedrática **Mónica De La Fuente**, la cual tenía una visión mucho más fisiológica del proceso de envejecimiento (de la cual yo carecía), lo que me hizo querer aprender de ella. Le escribí un email y me dijo que me pasase por su laboratorio. Al verla, enseguida me atrajo su personalidad carismática. Me contó con un entusiasmo indescriptible las líneas de investigación de su laboratorio entre las que se encontraban: edad biológica, comunicación

neuroinmunoendocrina, modelos de envejecimiento prematuro, así como infinidad de estrategias para enlentecer el proceso de envejecimiento, como estrategias nutricionales, sociales y algunas más “esotéricas” como radiaciones electromagnéticas. Ella también se salía de ese “estereotipo” de investigador serio y recio y desde ese momento supe que quería trabajar con ella. A pesar de que su laboratorio no estaba adscrito al máster que yo cursaba, me dijo que sí que podía llevar a cabo mi trabajo final de máster con ella. Empecé continuando con la línea que había comenzado en Dinamarca bajo el estudio de marcadores de respuesta al estrés celular, a la vez que empecé a aprender infinidad de técnicas de determinación de función inmunitaria, estrés oxidativo, pruebas conductuales, así como manejo de ratones, aunque no formaban parte de mi TFM. Tras 7 meses de estar llevando a cabo mi trabajo fin de máster, me llamó a su despacho y me dijo que teníamos un lote de ratones adultos en el animalario, y que sería muy interesante llevar a cabo un estudio longitudinal de los mismos para encontrar marcadores que permitiesen determinar la velocidad de envejecimiento, pero que había que empezar ahora cuando los ratones eran adultos. Yo eché cuentas rápidamente, los ratones tenían 8 meses de edad y podían vivir hasta los 30 meses. Dudé unos instantes. Fue entonces cuando me dijo que si me había planteado llevar a cabo una tesis doctoral. No me lo pensé ni un segundo, le dije que sí que quería realizar la tesis con ella.

Realmente, es difícil expresar la admiración que siento por mi directora Mónica De La Fuente. Ella es una mujer inteligente, fuerte y una trabajadora nata. Tiene una pasión tal por la investigación que ha sido capaz de renunciar a muchísimas cosas de índole personal, por sacar adelante su laboratorio. Ella vive por y para su grupo de investigación. En este sentido, no se me ocurre ninguna otra persona mejor para ser tu director de tesis. Nunca he conocido a una persona con una capacidad de trabajo tal. Su agenda diaria cuenta con más de 20 cosas distintas y, sin embargo, siempre tiene un hueco para echarle una mano, ya sea plantear diseños experimentales, ver resultados, practicar una comunicación oral o estructurar un artículo. Además, su pasión es contagiosa, pocas cosas le hacen más feliz que discutir unos nuevos resultados que has obtenido y elucubrar teorías para explicar los mismos. Tiene una capacidad de asociación sensacional, pero sin duda, lo que todavía a día de hoy me asombra es su capacidad de transmitir una idea de forma escrita. Obviamente, Mónica, esta tesis no hubiese sido posible sin ti por lo que siempre te estaré profundamente agradecida.

La siguiente persona que fue también fundamental en el hecho de que me embarcase en la realización de una tesis doctoral fue mi entonces tutora de TFM **Carmen Vida** y hoy una de mis mejores amigas. Ella es indudablemente una de las mejores personas que he conocido jamás. Siempre mostró conmigo una paciencia infinita y dedicó millones de horas a enseñarme todo lo que hoy sé. En el momento en el que me decidí a comenzar la tesis, ella estuvo conmigo incontables mañanas, tardes y noches echándome una mano con todo lo que podía. Pero además de ser un referente para mí a nivel profesional, también lo es a nivel personal. Siempre ha sido capaz de conectar conmigo en el plano emocional y darme toda la fuerza y el apoyo que he necesitado. Carmen, siempre estaré en deuda contigo.

A continuación, quería agradecer a todos los compañeros con los que he tenido la oportunidad de trabajar a lo largo de estos cinco años. A los que ya no están: a **Nuria**, gracias por acogerme como a una más, a **Ianire**, gracias por tener una personalidad tan genial y por todos tus consejos, a **Idoia**, gracias por haberme brindado tu apoyo siempre, a **Oskarina**, gracias por haber estado siempre dispuesta a echarme una mano y por haberme dado tantos buenos momentos, a **Caroline**, gracias por toda tu ayuda y apoyo a lo largo de los años, a **Julia y Garrido**, gracias por todas aquellas conversaciones intentando salvar el mundo entre café y café, cigarro y cigarro. A

los que siguen: a **Noemí**, gracias por estar siempre dispuesta a todo conmigo, ya sea mandarme correos estúpidos, echarme una mano con cualquier tipo de formato imposible, ayudarme con los pedidos o simplemente bajarte conmigo a tomar el aire cuando sabes que estoy estresada. Siempre recordaré nuestros momentazos en el congreso de Barcelona. ¡Sabes que ahora te toca a ti echar el resto!, pero estoy segura de que puedes con eso y mucho más; a **Hikaru**, gracias por el buen carácter y la paz que siempre transmites trabajando a tu lado, a ti también te queda poco ya, así que te deseo toda la fuerza del mundo para esta etapa final. A **Estefanía**, gracias por haber estado ahí para apoyarme siempre. Tus ganas de trabajar y tu buena actitud van a hacer que puedas con todo.

También quería agradecer a mis “niñas” a los que he tutorizado TFG y TFM, a **Beatriz Jiménez, Nahomi Paspuel, Nadia Serroukh, Karen Montañó y Lara Miguélez**. Todas vosotras me habéis ayudado y enseñado muchas cosas, a veces incluso de mí misma. En especial, gracias a **Lara Miguélez**, eres una persona muy especial, sólo hace falta que te lo creas tú.

También me gustaría dar las gracias a todas las personas del Departamento que tanto me han ayudado. Especialmente a **Ana, Teresa Peláez y Teresa Rodríguez**. Gracias por escucharme en los momentos en los que ya no podía más y por darme siempre muy buenos consejos. Aunque pueden parecer irrelevantes, cualquier contacto con vosotras a lo largo de cada día siempre es positivo, y esos son los pequeños detalles que marcan la diferencia.

Ya fuera de la universidad, **mis amigos** también han contribuido enormemente a que me encuentre en este momento ahora. Ellos siempre han estado ahí para celebrar conmigo éxitos y fracasos. A mis amigos de Logroño, las cuales me ayudan a tener siempre presente mi “verdadero yo” y a los de Madrid, los cuales se han convertido en “la familia que se elige”. Sin su apoyo, nada de esto habría sido posible.

También quería agradecer a toda **mi familia**, y en especial a mis padres, mi hermana, mi tía y mi tía. Gracias por quererme tanto, por creer en mí y por vuestro apoyo incondicional, sin el cual no hubiera podido llegar hasta aquí. Todo el mérito es vuestro, por cuidarme, educarme y estar siempre a mi lado. Gracias **mamá y papá** por haberme dado siempre la libertad para hacer lo que he querido, por haberme apoyado en todas y cada una de mis decisiones y por enseñarme el valor de la responsabilidad, el trabajo y el esfuerzo. Gracias por todo. Nunca podré pagaros todo lo que habéis hecho por mí. Sois los mejores padres que se puede tener, os quiero mucho. Esta tesis va dedicada a vosotros. A mi hermana **Cristina**, quien, desde muy pequeña, siempre me ha preparado para la vida. Quizás, a través de técnicas “inusuales”, pero lo importante es que parte de la fortaleza que tengo hoy, se la debo también a ella. Sé que pase lo que pase siempre vas a estar ahí para apoyarme. Te quiero mucho y estoy muy orgullosa de tu “crecimiento en espiral”. A **mi tía**, quien siempre me ha tratado como a una hija y ha estado siempre disponible para mí. A mi **yaya**, que es una persona fundamental en mi vida. Ella siempre me ha recordado lo que verdaderamente es importante en la vida y siempre ha confiado mucho en mí. “La que vale, vale para todo”.

Y, por último, pero no menos importante, a **Krzysztof**, mi novio, que es la mejor persona que he conocido. Aún recuerdo cuando le dije que quería hacer la tesis aquí en Madrid, cuando él vivía en Dinamarca y la discusión que nos costó. Él, siempre ha sabido lo importante que esta tesis es para mí. Siempre me ha ayudado a perseguir mis sueños y fue capaz de renunciar a todo y venirse a Madrid conmigo a apoyarme día a día en conseguir mis metas. Te amo, hoy y siempre.

Índice

RESUMEN	19
ABSTRACT	25
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	31
1.1. CARACTERÍSTICAS DEL ENVEJECIMIENTO	33
1.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO	34
1.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO BASE DEL ENVEJECIMIENTO	37
1.3.1. COMPUESTOS OXIDANTES	37
1.3.2. DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	39
1.3.3. MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO	41
1.3.4. CAMBIOS EN LOS COMPUESTOS OXIDANTES Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES CON EL ENVEJECIMIENTO.....	43
1.4. SISTEMA INMUNITARIO	44
1.4.1. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO	44
1.4.2. ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO: INMUNOSENESCENCIA	49
1.4.2.1. Cambios en las poblaciones leucocitarias con la edad.....	50
1.4.2.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad	52
1.5. LA TEORÍA DE LA OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN DEL ENVEJECIMIENTO	56
1.6. EL CONCEPTO DE EDAD BIOLÓGICA.....	57
1.7. EL SISTEMA INMUNITARIO COMO MARCADOR DE EDAD BIOLÓGICA Y PREDICTOR DE LONGEVIDAD	59
1.8. ENVEJECIMIENTO Y FRAGILIDAD.....	61
1.9. EL ENVEJECIMIENTO SALUDABLE: INDIVIDUOS QUE ALCANZAN UNA ELEVADA LONGEVIDAD	64
1.10. LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA	67
1.11. ENVEJECIMIENTO ACELERADO: INADECUADA RESPUESTA AL ESTRÉS.....	68
1.12. ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	74
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	79
3. RESULTADOS	87
CAPÍTULO UNO: Validación de una serie de parámetros de función y de estrés oxidativo en células inmunitarias como marcadores de edad biológica, mediante su estudio a distintas edades, en el proceso de envejecimiento, en ratones (longitudinal) y humanos (transversal), así como en un modelo de ratones adultos con envejecimiento prematuro.	89

CAPÍTULO DOS: Identificación de mecanismos celulares y moleculares implicados en la velocidad de envejecimiento y longevidad, mediante su estudio en ratones de distintas edades incluyendo aquellos que de forma natural alcanzan una elevada longevidad y ratones con envejecimiento prematuro.	109
CAPÍTULO TRES: Estudio de la relación existente entre una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales y de fragilidad, y la esperanza de vida alcanzada por cada ratón.	133
CAPÍTULO CUATRO: Validación de parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio como marcadores, en humanos, de envejecimiento acelerado, patológico y como predictores de supervivencia en centenarios tras un ingreso hospitalario e indicadores de recuperación.	167
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	207
4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL PRIMER CAPÍTULO	209
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO OBJETIVO	215
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL TERCER OBJETIVO	224
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL CUARTO OBJETIVO	234
5. DISCUSIÓN GENERAL	247
6. CONCLUSIONES	261
7. CONCLUSIONS	267
8. BIBLIOGRAFÍA	273
9. ANEXO I	315
ABREVIATURAS	317
ESCALA DE ESTRÉS PERCIBIDO (PSS: Perceived Scale Stress)	321
EXAMEN COGNOSCITIVO MINI MENTAL (MMSE: Mini Mental State Examination)	323
VALORACIÓN CLÍNICA DE DEMENCIA (CDR: Clinical Dementia Rating)	325
10. ANEXO II	327

RESUMEN

MARCADORES DE VELOCIDAD DE ENVEJECIMIENTO Y PREDICTORES DE LONGEVIDAD

El envejecimiento puede definirse como un proceso universal en el que se producen toda una serie de cambios biológicos, y que se caracteriza por una disminución progresiva y generalizada de la función del organismo y por una menor capacidad para restaurar la homeostasis. Además, el proceso de envejecimiento presenta una gran heterogeneidad, de manera que los individuos de una población, pertenecientes a una misma especie y con idéntica edad cronológica, pueden hacer este proceso a diferente velocidad. Este hecho ha llevado a desarrollar el concepto de edad biológica, para cuyo establecimiento es necesario determinar una serie de variables que cambian con la edad y que están relacionadas con una muerte prematura. Esta edad biológica es más adecuada que la cronológica como indicador del estado de salud, el rendimiento físico y mental, así como de la velocidad a la que está envejeciendo un individuo.

El sistema inmunológico, uno de los sistemas reguladores, junto con el sistema nervioso y endocrino, con los que se comunica, y que es clave en el mantenimiento de la homeostasis, se deteriora con la edad, proceso conocido como inmunosenescencia. De este modo, prácticamente todos los componentes de este sistema y las interacciones entre ellos sufren un proceso de reestructuración, produciéndose cambios que incluyen tanto el aumento como la disminución de ciertos parámetros, siendo estas modificaciones la base de la mayor morbilidad y mortalidad que se da al envejecer. En el contexto de la Teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento, se ha propuesto que los cambios en la función inmunitaria con la edad son consecuencia del establecimiento del estrés oxidativo-inflamatorio crónico de los leucocitos, el cual puede incidir en la oxidación e inflamación general del organismo y consecuentemente en su velocidad de envejecimiento. Por ello, se planteó la hipótesis de que hay parámetros de función inmunitaria y de estado de estrés oxidativo e inflamatorio que pueden resultar ser marcadores de la velocidad a la que está envejeciendo cada individuo (su edad biológica y fragilidad), y consecuentemente permitan predecir tanto una longevidad saludable como un envejecimiento prematuro o patológico.

En base a esto, los objetivos planteados en la siguiente tesis han sido los siguientes:

1^{er} objetivo: Validación de una serie de parámetros de función y estrés oxidativo en células inmunitarias como marcadores de edad biológica, en humanos y en ratones.

2º objetivo: Identificación de mecanismos celulares y moleculares implicados en la velocidad de envejecimiento y longevidad, mediante su estudio en ratones de distintas edades incluyendo aquellos que de forma natural alcanzan una elevada longevidad y ratones con envejecimiento prematuro.

3º objetivo: Estudio de la relación existente entre una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales y de fragilidad y la esperanza de vida alcanzada por cada ratón.

4º objetivo: Validación de parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio, en humanos, como marcadores de envejecimiento acelerado, patológico y como predictores de supervivencia en centenarios.

Los resultados del 1º objetivo permiten validar una serie de parámetros de función inmunitaria y de estado redox como marcadores de la velocidad de envejecimiento ya que éstos se deterioran a medida que avanza la edad tanto en humanos como en ratones. Además, los individuos longevos, los cuales llevan a cabo un envejecimiento saludable, muestran dichos parámetros con valores similares a los observados en adultos, mientras que aquellos ratones que presentan en la edad adulta valores propios de animales cronológicamente viejos, tienen una menor longevidad.

En cuanto al 2º objetivo, los resultados indican que la linfoproliferación y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en ausencia de estimulación aumenta con la edad, mientras que la liberación de citoquinas anti-inflamatorias disminuye. Sin embargo, al envejecer, en respuesta a un estímulo se deterioran todas esas funciones. Por otro lado, los ratones longevos presentan una respuesta proliferativa de sus linfocitos más temprana que los ratones de otras edades. Además, se caracterizan por presentar un cociente IL-10/TNF- α superior a los ratones viejos y similar al observado en adultos, por lo que el cociente IL-10/TNF- α se propone como marcador de longevidad. Se demuestra también que la concentración basal de la chaperona Hsp70 experimenta cambios con la edad de forma diferencial en tejidos compuestos por células mitóticas y post-mitóticas. En ambos tipos de tejido, los ratones longevos muestran concentraciones similares a las observadas en adultos y aquellos animales que en la edad adulta presentan una concentración similar a la observada en viejos, tienen una menor longevidad. Por ello, se propone a esta chaperona como un posible marcador de velocidad de envejecimiento.

Los resultados del 3º objetivo demuestran que el papel predictor de longevidad de la mayoría de los parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio investigados depende de la edad del individuo. De manera que, mientras que algunos correlacionan

fuertemente con la esperanza de vida de cada ratón en la edad adulta, otros lo hacen en edades avanzadas. Además, en base a los parámetros que resultaban ser mejores predictores de longevidad en la edad adulta, se construyeron una serie de modelos matemáticos de predicción de longevidad. Se validó la reproducibilidad de los mismos en otro grupo de ratones y se observó que aquellos modelos que incluían parámetros de función inmunitaria resultaban ser los más robustos. Asimismo, se demostró que el índice de fragilidad cuantificado mediante el "Test Valencia" es predictivo de esperanza de vida en ratones, no sólo en la vejez, también en la edad madura y en la adulta.

En lo referente al 4º objetivo, los resultados muestran que cuanto mayor es el grado de estrés percibido en mujeres de mediana edad, mayor es el estrés oxidativo e inflamatorio y peor es la función inmunológica y, por ende, mayor es la edad biológica de las mismas. También se evidenció que ciertos parámetros de estrés oxidativo en sangre periférica tienen potencial para ser usados como marcadores prodrómicos de la Enfermedad de Alzheimer. Asimismo, se validó el uso de una serie de funciones inmunitarias, parámetros redox e inflamatorios como predictores de supervivencia ante un ingreso hospitalario en una población de centenarios y como indicadores de recuperación.

Palabras clave: Envejecimiento; Longevidad; Sistema Inmunitario; Oxidación-Inflamación; Marcadores

ABSTRACT

MARKERS OF RATE OF AGING AND PREDICTORS OF LONGEVITY

Aging may be defined as a universal process in which a series of biological alterations take place and which is characterized by the progressive and general deterioration of the functions of the organism that leads to a lower ability to adaptively react to changes and preserve homeostasis. Moreover, the aging process is heterogeneous in such a way, that the diverse members of a population of the same chronological age can be aging at different rates. This phenomenon led to the concept of “biological age”. For the determination of this it is necessary to identify a series of markers that change with age and that are associated with a premature death. This biological age is more accurate than the chronological one as an indicator of the health status, physical and mental capacity as well as of the rate of aging experienced by each individual.

The immune system, one of the regulatory systems that, together with the nervous and the endocrine systems, is essential for the preservation of homeostasis, experiences an age-related decline in its function, which has been termed as immunosenescence. Thereby, almost every component of the immune system undergoes striking age-associated restructuring, leading to changes that may include enhanced as well as diminished functions. These alterations are the cause of the increased age-related morbidity and mortality. According to the oxidative-inflammatory theory of aging, the age-related deterioration of the immune system is the result of the chronic oxidative and inflammatory stresses. Moreover, the immune system, due to its capacity of producing oxidant and inflammatory compounds, can modulate the oxidative and inflammatory stress of the organism, and consequently its rate of aging. Therefore, it was hypothesized that certain immune function as well as oxidative and inflammatory stress parameters have the potential to be used as markers of the rate of aging of an individual (his/her biological age and frailty), and, as such, could be used to predict a healthy longevity as well as a premature or pathological aging. On this basis, the objectives of the thesis are the following:

1st objective: Validation of a series of immune function and oxidative stress parameters as markers of biological age in humans as well as in mice.

2nd objective: Identification of cellular and molecular mechanisms involved in the rate of aging and longevity, through their study in mice of different ages, including those that naturally reach a high longevity as well as those with premature aging.

3rd objective: Study of the association between a series of immune function, oxidative and inflammatory stress parameters, as well as behavioural and frailty indices and the life span of each mouse.

4th objective: Validation of a series of immune function, oxidative and inflammatory stress parameters in humans, as markers of accelerated and pathological aging and as predictors of survival in centenarians.

The results obtained in the 1st objective validate some immune function and redox parameters as markers of the rate of aging given that they experience an age-related decline in both humans and mice. Moreover, long-lived individuals, which are known to experience healthy aging, display these parameters with similar values to those observed in adults, whereas those mice that show similar values at the adult age to those obtained in chronologically old mice, have a shorter longevity.

With respect to the 2nd objective, the results show that the lymphoproliferative capacity and the release of pro-inflammatory cytokines in basal conditions experience an age-related increase, whereas the release of anti-inflammatory cytokines decreases. However, in response to a stimulus, there is an age-related impairment in all these responses. Furthermore, long-lived mice have an earlier lymphoproliferative response than mice from other ages and show a higher IL-10/TNF- α ratio than old mice and similar to that of adult mice. Hence, the IL-10/TNF- α ratio is postulated as a marker of longevity. Besides, the results show that the concentration of Hsp70 varies with age, depending on the mitotic or post-mitotic composition of the tissue analysed. In all tissues, long-lived mice have similar Hsp70 concentrations to those observed in adult mice, whereas adult mice, which show similar levels to those found in old mice, have a shorter life span. Therefore, the basal concentration of Hsp70 is proposed as a marker of the rate of aging.

The results from the 3rd objective demonstrate that the predictive role towards longevity of most of the immune function, oxidative and inflammatory stress parameters investigated depends on the age of the individual. Thus, whereas some parameters were found to have a strong correlation towards life span at the adult age, others correlated only at advanced ages. In addition, mathematical models for life span prediction were developed on the basis of the parameters that had the strongest association with life span at the adult age. These models were cross-validated with a different set of mice and it was found that those models that included immune function parameters were the most robust. Likewise, frailty quantified by the “Valencia Score” was found to be predictive of life span not only at the old, but also at the adult and mature ages.

With respect to the 4th objective, the results show that middle-aged women with high perceived stress levels have a higher oxidative and inflammatory state, a worse immune function and, consequently, a higher biological age than those women with lower stress levels. Moreover, it was found that certain oxidative stress parameters quantified in peripheral blood have the potential to be used as prodromal markers of Alzheimer's Disease. Additionally, the results verify the usefulness of some immune function, redox and inflammatory stress parameters as predictors of survival and indicators of recovery in centenarians at the moment of hospital admission.

Keywords: Aging; Longevity; Immune system; Oxidation-Inflammation; Markers.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL ENVEJECIMIENTO

En las últimas décadas, debido al aumento de la longevidad de la población y a la disminución de la tasa de natalidad junto con la mejora sanitaria y social, la proporción de personas envejecidas está aumentando rápidamente en la mayoría de países desarrollados. Según estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el año 2050, España será el país más envejecido del mundo, con un 40% de la población mayor de 60 años. Este hecho ha generado que el interés por el estudio del proceso de envejecimiento, así como de las consecuencias que conlleva, esté aumentando de manera exponencial.

Cuando se habla del envejecimiento, es necesario distinguir entre esperanza de vida o longevidad media y esperanza de vida o longevidad máxima. Mientras que la primera representa la media de años que viven los individuos de una población que han nacido en una misma fecha, la segunda se define como el tiempo máximo que vive un individuo por pertenecer a una determinada especie. Así, en el caso del ser humano, dicha longevidad máxima fue alcanzada por la francesa Jeanne Louise Calment (122 años, 5 meses y 14 días), mientras que en el caso del ratón ésta sería de unos 3 años. Por tanto, la longevidad máxima es específica de la especie a la que el individuo pertenece y se trata de un valor fijo, determinado genéticamente, mientras que la esperanza de vida media va a depender, principalmente, de factores ambientales y de estilo de vida. Además, la longevidad máxima no puede aumentar (a menos que se modifique la genética de la especie), mientras que la media sí, en función de los avances sanitarios y de cambios en el estilo de vida.

Actualmente, España es el cuarto país más longevo del mundo, con una esperanza de vida media de 83 años. Y de mantenerse la tendencia actual, va camino de superar a Japón, Suiza y Singapur hasta ocupar el primer puesto en 2040, gracias a un aumento de 2,8 años. Así lo afirma un estudio elaborado por el *"Institute for Health Metrics and Evaluation"* (IHME) de Washington, en el que se analizan los diferentes escenarios que puede seguir la salud global en las próximas décadas ([Foreman et al. 2018](#)).

Dado que el proceso de envejecimiento tiene múltiples facetas, son muchas las definiciones que han surgido para intentar explicar dicho proceso. En 1977, Strehler indicó que las cuatro características que definen el proceso del envejecimiento eran: a) universal, ya que tiene lugar en todos los individuos, b) progresivo, debido a que avanza gradualmente, c) intrínseco, puesto que las causas del proceso tienen un origen endógeno, y d) deletéreo, ya que tiene un carácter perjudicial para el individuo ([Strehler, 1977](#)), aunque no para la especie. En el contexto que nos

atañe, el envejecimiento ha sido definido como el deterioro progresivo y generalizado de las funciones del organismo, que conduce a una menor capacidad de responder y adaptarse a los cambios que experimentan, es decir, una menor capacidad de mantener la homeostasis (De la Fuente y Miquel, 2009). A medida que esta capacidad de respuesta y adaptación disminuye, nos hacemos más vulnerables, aumentando proporcionalmente la tasa de morbilidad y mortalidad (Pomatto y Davies, 2017; Pomatto, 2019). Un claro ejemplo de este hecho es la incapacidad que presentan las personas mayores para afrontar temperaturas extremas, infecciones y en general, situaciones de estrés, pudiendo llegar a causarles la muerte. En cambio, los mismos factores en el adulto no conllevarían ningún riesgo de mortalidad. Por tanto, aunque el envejecimiento es un proceso biológico y no una enfermedad, constituye el principal factor de riesgo para padecer diversas enfermedades, entre las cuales estarían las cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas y el cáncer (Franceschi et al. 2018). El problema actualmente está en que el aumento en la esperanza de vida media de la población no implica un mantenimiento de la calidad de vida a lo largo de los años o un aumento de la llamada “*healthspan*”, que hace referencia al periodo de vida libre de enfermedad. Por tanto, se hace necesario conocer los mecanismos que subyacen a este proceso de envejecimiento, con el fin de aumentar esa “*healthspan*” (Seals et al. 2015; Palliyaguru et al. 2019), también llamada “*youthspan*” (Longo, 2018), y así mantener una adecuada salud a lo largo del envejecimiento y especialmente en edades avanzadas.

Por todo ello, el conocimiento de los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento es de suma importancia ya que nos proporcionaría elementos diana sobre los que incidir para poder ralentizarlo, aumentando la “*healthspan*”, y disminuyendo o posponiendo la prevalencia de múltiples enfermedades asociadas a este proceso.

1.2. TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

La demostración de la complejidad de los cambios que tienen lugar en el proceso de envejecimiento es el hecho de que existan más de 300 teorías que intentan explicar este proceso (Medvedev, 1990) y que ninguna de ellas haya sido aceptada de forma unánime. Para dar respuesta al **cómo envejecemos**, estas teorías pueden clasificarse en dos grandes apartados: por un lado, las “Teorías deterministas o genéticas” y por otro, las “Teorías estocásticas o epigenéticas”.

Las teorías deterministas proponen que el envejecimiento es el resultado de un proceso genéticamente programado, donde los organismos poseerían genes específicos de longevidad. En este grupo cabe destacar la **teoría de Hayflick** ([Hayflick, 1965](#)), según la cual las células tienen un “límite mitótico” que marcaría el número máximo de divisiones que son capaces de tener, proponiendo que la pérdida de la capacidad mitótica sería la causa del envejecimiento celular. Dentro de este grupo, se encuentra también la **teoría del acortamiento de los telómeros** ([Olovnikov, 1973](#); [Harley et al. 1990](#)), en la que el acortamiento de los telómeros en cada división celular sería el responsable de la pérdida de la capacidad mitótica de las células. Sin embargo, estas teorías no son suficientes para explicar la senescencia que tiene lugar en células postmitóticas, de escasa o nula proliferación, como la mayoría de las neuronas ([Goyns, 2002](#)). Además, en la actualidad no existen evidencias directas de la existencia de genes específicos que hayan sido seleccionados para causar activamente el envejecimiento, los denominados “gerontogenes”. En cambio, se ha propuesto que ciertos genes podrían tener un antagonismo pleiotrópico, de tal modo que fueron seleccionados debido a sus efectos pro-vida (“vitagenes”) hasta alcanzar la etapa reproductiva, pero que tienen efectos perjudiciales en la etapa post-reproductiva. Esto supone que dichos genes no fueron seleccionados como genes responsables del envejecimiento, pero se manifiestan como “gerontogenes virtuales” debido a su contribución en el proceso de envejecimiento ([Rattan, 2018](#)).

Por otro lado, las teorías estocásticas o epigenéticas señalan que el envejecimiento es el resultado de procesos debidos al azar y no determinados por un programa genético. De entre ellas, cabe destacar la **“teoría de la oxidación o de los radicales libres”**, propuesta por [Harman \(1956\)](#), la cual a día de hoy es la más aceptada entre los gerontólogos. Esta teoría, propone que el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de daño oxidativo en las biomoléculas, causado por la hiperreactividad de los radicales libres que se producen en nuestras células como resultado de la inevitable utilización del oxígeno. Los radicales libres reaccionan con todo tipo de biomoléculas, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos al intentar aparear el electrón que tienen desapareado, tomándolo de cualquiera de esas moléculas que tengan cercanas. Este hecho supone la alteración de dichas moléculas y, consecuentemente, la pérdida de su funcionalidad. Dado que la principal producción de ROS tiene lugar en la cadena respiratoria mitocondrial, el ADN mitocondrial constituiría la primera diana de esta oxidación, especialmente en células post-mitóticas que no tienen la capacidad de “diluir” sus orgánulos dañados en cada división. Esto dio paso a lo que se conoce como la **“teoría mitocondrial del envejecimiento”**, que ha sido perfilada por distintos autores ([Harman, 1972](#); [Miquel et al. 1980](#); [Miquel, 1998](#); [Barja, 2002](#); [Pamplona y Barja, 2003](#); [Barja, 2004](#); [Barja, 2013](#)). Recientemente, la

pérdida de radicales libres por parte de la cadena respiratoria mitocondrial de electrones ha sido propuesto como uno de los mecanismos efectores dentro de un mismo programa de envejecimiento, junto con el grado de saturación de las membranas lipídicas y la autofagia, entre otros ([Barja, 2019](#)).

Posteriormente a Harman, se demostró que las especies reactivas del oxígeno (ROS) son fisiológicamente esenciales para la transducción de señales, regulación génica y del propio estado de oxidación, entre otros procesos vitales, por lo que su completa eliminación sería perjudicial. Por tanto, se postuló la “**teoría del estrés redox**”, la cual propone que la pérdida funcional asociada al envejecimiento es causada debido a un cambio progresivo en el estado redox de las células hacia un estado pro-oxidante. Así, este estado pro-oxidante conduciría a la sobreoxidación de residuos tiólicos en proteínas de transducción y consecuentemente a la alteración de las vías de señalización celular fundamentales para un correcto funcionamiento celular ([Sohal y Orr, 2011](#)). Dentro de las teorías estocásticas, se encontrarían también las que tienen en cuenta a los sistemas fisiológicos como la “**teoría inmunológica**” y la “**teoría neuroendocrina**” ([Walford, 1969](#); [Meites et al. 1987](#); [Fabris, 1991](#)). Dada la importancia que tienen los sistemas neuroendocrino e inmunitario en la regulación de todos los procesos fisiológicos, la pérdida de la funcionalidad asociada a la edad que experimentan ambos sistemas también ha sido propuesta como causa del envejecimiento. Sin embargo, no todos los organismos que envejecen tienen complejos sistemas neuroendocrinos o una inmunidad adaptativa definida. Por tanto, estas teorías describen cambios que son consecuencia del proceso de envejecimiento, pero no causa, ya que no cumplen el requisito de universalidad ([De La Fuente y Miquel, 2009](#)).

Además, para dar respuesta al **por qué envejecemos**, otro grupo de teorías, las llamadas evolutivas, ofrecen una explicación plausible a este hecho. Entre ellas, la **teoría de la muerte programada** considera que el envejecimiento es un proceso que ha sido seleccionado con el fin de evitar la competitividad entre los organismos y su progenie por la comida y el espacio ([Weissman, 1891](#)). Otra teoría, la del **antagonismo pleiotrópico**, sugiere que el envejecimiento es la consecuencia de la selección natural de unos genes que proveerían al organismo de un vigor máximo durante su edad reproductora (adulta), pero que después, esos mismos genes tendrían efectos perjudiciales para el individuo ([Williams, 1957](#)), el cual como tal sería dispensable una vez haya traspasado sus genes, favoreciéndose de este modo el mantenimiento de la especie. Dentro de este grupo podría incluirse también la “teoría de la inflamación”, ([Fulop et al. 2014](#)) la cual sostiene que, la selección natural de mecanismos pro-inflamatorios permitirían al individuo ser más resistente frente a infecciones hasta alcanzar la edad

reproductora, pero conducirían al establecimiento de un grado de inflamación crónica en la vejez. Este hecho, dio lugar al concepto de “**inflammaging**” (Franceschi, 2000a), que propone que tal inflamación resulta perjudicial para el individuo y se encuentra relacionada con numerosas enfermedades asociadas a la edad (Franceschi y Campisi, 2013; Xia et al. 2016; Franceschi et al. 2018).

1.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO BASE DEL ENVEJECIMIENTO

Se denomina estrés oxidativo a la situación en la que las células están expuestas a un ambiente pro-oxidante que ha sobrepasado los mecanismos de defensa antioxidante, debido al desequilibrio del balance oxidantes/antioxidantes en favor de los primeros, afectándose el estado redox celular (Sies, 1985). La generación de compuestos oxidantes, como los radicales libres y otros, es un proceso normal e inevitable en el organismo, ya que éstos están implicados en distintas vías de señalización indispensables para la vida (Sena y Chandel, 2012). No obstante, cuando están en exceso, debido a una producción de los mismos descontrolada o a una disminución de las defensas antioxidantes, se produce el establecimiento de un estrés oxidativo, hecho que ocurre al envejecer y que conlleva la acumulación de daño de las diferentes biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), la pérdida de funcionalidad y muerte celular (Pizzino et al. 2017).

1.3.1. COMPUESTOS OXIDANTES

El oxígeno (O_2) es necesario para la vida de la mayoría de los seres vivos ya que actúa, en la cadena respiratoria mitocondrial, como aceptor final de cuatro electrones, dando lugar a una molécula de agua, siendo fundamental para la síntesis de ATP. Pero cuando la reducción del oxígeno es parcial, se generan especies reactivas derivadas del mismo. Así, cuando éste capta un electrón, se produce el radical superóxido (O_2^-), que puede dar lugar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^\cdot), el más tóxico de todos. El término radical o radical libre, se refiere a cualquier molécula o átomo que contiene al menos un electrón desapareado. Esto hace que sea muy inestable y reactivo hacia otras moléculas, lo que le confiere una vida media muy corta. Así, el radical superóxido o el radical hidroxilo son radicales libres, mientras que el peróxido de hidrógeno no lo es. Por ello, de forma más global a todos estos compuestos se les denomina especies reactivas del oxígeno (del inglés, “*Reactive Oxygen Species*” ROS) (Halliwell, 2007; Vida et al. 2014; Höhn et al. 2017; De la Fuente, 2018a). También existen las especies

reactivas del nitrógeno (RNS), entre las que destacan el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito y el dióxido de nitrógeno (Moncada et al. 1991; McAndrew et al. 1997; Adams et al. 2015; De la Fuente, 2018a). La principal fuente de producción del anión superóxido es la cadena de transporte de electrones mitocondrial, aunque también se produce por la acción de diversas enzimas, como la xantina oxidasa o la NADPH-oxidasa (Ramón, 1993; Yang et al. 2013; Chiste et al. 2015). Este anión superóxido va a ser transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) mediante la incorporación de un electrón y dos protones. Dado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es muy estable y es capaz de difundir a través de las membranas biológicas (Chance et al. 1979), puede actuar en lugares alejados de donde ha sido generado (Halliwell, 1992), por lo que juega un papel fundamental como regulador de múltiples procesos biológicos (Brieger et al. 2012; Larosa y Remacle, 2018). El H_2O_2 es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Sin embargo, en presencia de iones de metales de transición (sobre todo ion ferroso, Fe^{+2} , y, en menor medida, el cuproso, Cu^+ , y otros iones), se reduce dando lugar al radical hidroxilo, mientras que el metal correspondiente se oxida por cesión de un electrón a la especie que se reduce (Haber y Weiss, 1934).

Existen numerosas localizaciones de generación endógena de ROS, entre los cuales, como más relevantes destacan: la cadena de transporte de electrones mitocondrial (una de las fuentes más importantes de radicales libres en las células), los microsomas, los peroxisomas, el retículo endoplásmico, enzimas como la ciclooxigenasa, la NADPH oxidasa o la xantina oxidasa. En el caso de la xantina oxidasa, esta enzima es conocida por su papel catalítico en la degradación de las purinas, aunque cataliza la hidroxilación de una amplia gama de sustratos y está considerada como una de las principales fuentes enzimáticas productoras de ROS y RNS (Harrison, 2002; Berry y Hare, 2004; Kumar et al. 2018). La NADPH-oxidasa es un complejo enzimático en el que el NADPH es el donador de electrones de las 5 isoformas de Nox identificadas, cada una de las cuales con un sitio catalítico diferente (Nox 1-5). Sus diversos componentes se ensamblan en la membrana plasmática, transfiriendo electrones de NADPH al oxígeno, produciendo anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Nox2 forma parte de la membrana celular de los leucocitos y Nox4 se localiza en la mitocondria (Van Heerebeek et al. 2002; Yang et al. 2013; De la Fuente, 2018a). Las células inmunitarias, especialmente las fagocíticas, son otra fuente importante de oxidantes. Los fagocitos atacan y erradican patógenos usando una mezcla de oxidantes, como el anión superóxido, H_2O_2 o NO. Este mecanismo inmunitario innato se denomina estallido respiratorio (Yang et al. 2013) y es mediado por Nox2, un complejo enzimático que actúa desde las membranas de los fagosomas. Además, se ha descrito que otras células no fagocíticas, como

los fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas vasculares también poseen enzimas productoras de superóxido, análogas al complejo NADPH-oxidasas fagocítico (Van Heerebeek et al. 2002; De la Fuente, 2018a).

1.3.2. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Todos los organismos aerobios han desarrollado defensas antioxidantes, tanto enzimas como compuestos no enzimáticos, para evitar el establecimiento del estrés oxidativo y de la consecuente oxidación de los distintos componentes celulares. Dentro de las defensas antioxidantes endógenas se encuentran toda una serie de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), entre otras, las cuales se distribuyen en el citoplasma celular, así como en varios orgánulos, trabajando de forma conjunta e integrada para convertir las ROS en moléculas inocuas, como el agua o el oxígeno molecular (Freeman y Grapo, 1982; Fridovich, 1997; Halliwell, 1997; Vida et al. 2014; De la Fuente, 2018a). La **Figura 1** esquematiza las principales vías de formación y descomposición de las ROS.

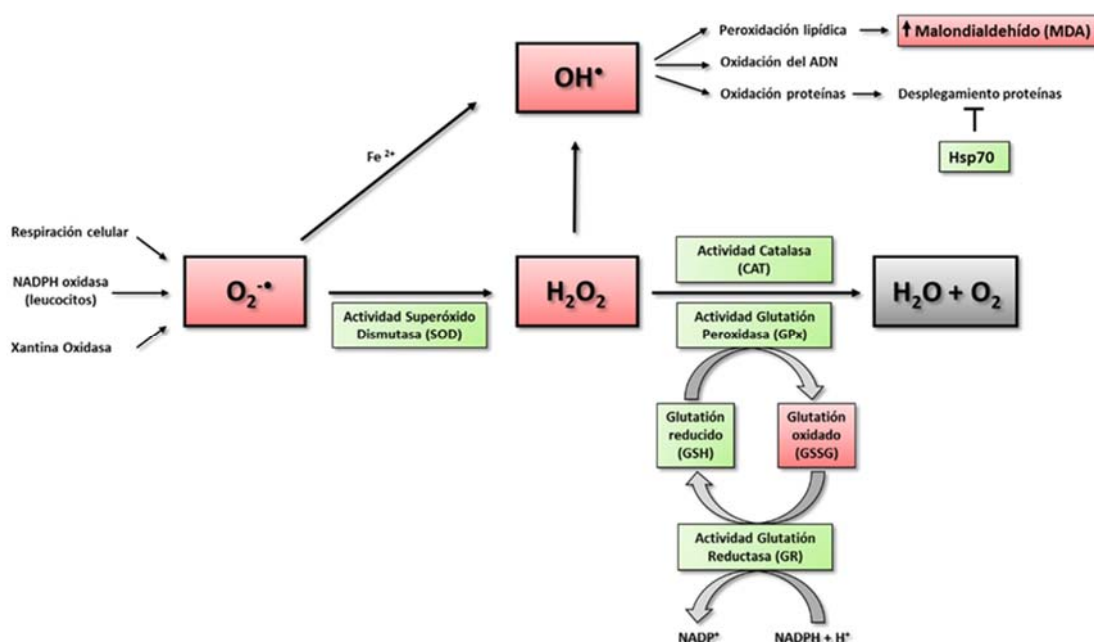


Figura 1. Vías de formación y descomposición de las especies reactivas de oxígeno (del inglés, “Reactive Oxygen Species”: ROS). El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) puede ser generado en la cadena respiratoria mitocondrial de electrones o a través de las enzimas NADPH-oxidasas y Xantina Oxidasa. Este radical, en presencia de metales, puede dar lugar al radical hidroxilo (OH^{\cdot}) el cual va a oxidar lípidos, generando malondialdehído (MDA), ADN y proteínas, lo que inducirá la síntesis de la Heat-shock protein 70 (Hsp70). Por ello, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) puede ser transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD). Este peróxido de hidrógeno, a su vez, puede ser transformado en agua y oxígeno por acción de las enzimas antioxidantes Catalasa (CAT) y Glutatión Peroxidasa (GPx). Esta última para llevar a cabo su actividad, cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). Dado que el GSH es fundamental para el mantenimiento del ambiente reductor dentro

de las células, la enzima Glutación Reductasa (GR), va a llevar a cabo la reacción inversa, reduciendo el GSSG a GSH, a expensas del NADPH.

La enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) es la primera en actuar catalizando la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por lo que constituye la principal línea de defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Tras ella, la neutralización del H_2O_2 puede ser llevada a cabo por la enzima antioxidante catalasa o por la enzima glutación peroxidasa. Mientras que la actividad catalasa neutraliza directamente el H_2O_2 transformándolo en agua, la enzima glutación peroxidasa requiere para ello llevar a cabo la oxidación del antioxidante glutación reducido (GSH) a glutación oxidado (GSSG) (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999; Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013; Couto et al. 2016). Este glutación oxidado es, a su vez, neutralizado por la enzima glutación reductasa, transformándolo en su forma reducida (GSH) a expensas de la oxidación del NADPH (López et al. 1990; Couto et al. 2016). Así, ambas enzimas trabajan de forma conjunta dando lugar al denominado ciclo del glutación, fundamental en la eliminación y neutralización de numerosos compuestos oxidantes y en el mantenimiento del glutación reducido, principal compuesto antioxidante intracelular (Izawa et al. 1996; Couto et al. 2016). El hecho de que existan dos enzimas para la eliminación del H_2O_2 se debe a las características de esta especie reactiva del oxígeno. Así, cuando la concentración de H_2O_2 es baja, la enzima que actúa principalmente es la glutación peroxidasa mientras que, en presencia de altas concentraciones, la eliminación del H_2O_2 es llevada a cabo, principalmente, por la catalasa (Yan y Harding, 1997; Couto et al. 2016).

Además, hay toda una serie de compuestos antioxidantes no enzimáticos de pequeño tamaño encargados de neutralizar las ROS cuando se produce un exceso de las mismas. Entre ellos se encuentran, además del glutación ya mencionado, el ácido úrico, la ubiquinona o la tiorredoxina. También existen compuestos antioxidantes de origen exógeno, como el ácido ascórbico o vitamina C (para el ser humano, no siéndolo para muchos animales como los de experimentación), la vitamina E, los carotenoides o los numerosos compuestos del grupo de los polifenoles, cuya fuente de obtención es la dieta. Así, todos los compuestos antioxidantes, tanto endógenos como exógenos, colaboran entre ellos para mantener las ROS dentro de unas concentraciones óptimas, que permitan llevar a cabo una apropiada señalización celular, pero sin que sobrepasen a las defensas antioxidantes, previniendo el establecimiento del estrés oxidativo y con él, el daño oxidativo a las distintas moléculas celulares (Lu, 2013; Vida et al. 2014; De la Fuente, 2018a).

1.3.3. MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO

Cuando se establece un estrés oxidativo se produce daño a las diferentes macromoléculas, el cual puede ser valorado analizando diferentes marcadores del mismo. En los lípidos es donde se produce el mayor daño oxidativo generado por la acción de las ROS y RNS, en un proceso conocido como peroxidación lipídica. Los procesos de peroxidación lipídica van a afectar a los lípidos de membrana, donde los ROS y RNS van a atacar los dobles enlace carbono-carbono de los ácidos grasos poliinsaturados (del inglés, “*polyunsaturated fatty acids*”: PUFAs). Los PUFAs son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas, siendo los responsables, en buena medida, de la fluidez de ésta, así como del mantenimiento de la integridad celular, por lo que son de gran importancia para el normal desarrollo de las funciones celulares (Cross et al. 1987; Zielinski et al. 2017). El proceso de peroxidación lipídica consta de una serie de reacciones en cadena que provocan la formación de distintas ROS, y que conducen a la generación de un gran número de productos finales, que son altamente inestables y al romperse forman distintos residuos químicos, como aldehídos insaturados (Valenzuela, 1991; Ayala et al. 2014), entre los que destacan el **malondialdehído (MDA)**, considerado como un buen marcador de daño oxidativo en las membranas biológicas (Wong et al. 1987; Tsikas et al. 2017).

Pero el daño oxidativo también va a tener lugar en proteínas. En general, todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los ROS y RNS, principalmente por los radicales libres O_2^- y OH^- (Stadtman, 1992). Entre las modificaciones reversibles tenemos las que afectan a los grupos sulfhidrilo de las cisteínas, dando lugar a puentes disulfuro, conjugación con glutatión o ácido sulfénico. La metionina, otro aminoácido con un átomo de azufre, se oxida dando metionina sulfóxido. Todas estas oxidaciones pueden ser reducidas por distintos sistemas enzimáticos y por tanto pueden actuar como mecanismos de regulación de la función proteica. Entre las oxidaciones irreversibles tenemos una gran variedad de productos, destacando la formación de grupos carbonilo y carbamilo (aldehídos o cetonas) en lisina, prolina, arginina y treonina, que son utilizados como marcadores de daño a proteínas y que en la mayoría de los casos las inactivan. Además, estas oxidaciones pueden dar lugar a cambios estructurales y conformacionales de las proteínas, que causen el desplegamiento de las mismas y que resultan en la acumulación de proteínas mal plegadas (Freeman y Grapo, 1982; Gebicki y Gebicki, 1993; Tanase et al. 2016). Cuando los sistemas de degradación, como el proteasoma, no son capaces de eliminarlas de forma adecuada, bien porque están en exceso o debido al deterioro del propio proteasoma, las proteínas oxidadas

agregan entre sí y se acumulan en el interior celular, provocando toxicidad y muerte celular (Squier, 2001). Por ello, una forma de reparar este daño es mediante la inducción de una proteína chaperona que sea capaz de devolver las proteínas mal plegadas a su conformación nativa. De este modo, cuando aumenta el número de proteínas mal plegadas en el citoplasma celular, el factor de transcripción HSF-1 (heat-shock factor 1) trimeriza y se transloca al núcleo donde induce la síntesis de chaperonas o heat-shock proteins, principalmente la **Hsp70 (del inglés, “heat-shock protein” 70)**. Son muchas las funciones que han sido atribuidas a la Hsp70 intracelular, entre las que destacan: 1) asistir y facilitar el correcto plegamiento de proteínas que están siendo sintetizadas en el ribosoma, 2) proteger de la agregación proteica, 3) solubilizar agregados proteicos, 4) secuestrar proteínas mal plegadas en agregados mayores, 5) marcaje de aquellas proteínas desplegadas que no pueden ser replegadas para posterior degradación en el proteasoma (Demand et al. 2011), así como la 6) autofagia mediada por chaperonas (Dice et al. 2007). Por tanto, la Hsp70 juega un papel central en el mantenimiento del espacio homeodinámico celular, previniendo la agregación de proteínas, especialmente en condiciones de estrés oxidativo (Fernández-Fernández et al. 2017).

Por otro lado, los componentes del ácido desoxirribonucleico (ADN) también son muy susceptibles al daño oxidativo provocado por las ROS y RNS. Estas especies reactivas pueden generar mutaciones en el ADN dando lugar a la pérdida de expresión de numerosos genes por modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN (Halliwell y Auroma, 1991; Breen y Murphy, 1995). Además, también pueden contribuir a la iniciación o progresión de procesos de carcinogénesis, cuando estas modificaciones tienen lugar en genes supresores de tumores, cuya expresión puede ser modificada por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (González-Torres et al. 2000). La modificación oxidativa más frecuente suele darse a nivel de la guanosina, dando lugar a la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), un compuesto de gran importancia por su elevado efecto mutagénico (Kasai y Nishimura, 1984; Shibutani et al. 1991). Por otro lado, también hay que destacar que el ADN mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear, siendo unas 15 veces superior a éste (Richter et al. 1988), por lo que presenta una alta tasa de mutaciones, principalmente deleciones, que aumentan exponencialmente con la edad (Ozawa, 1995). Esto es debido a varios factores que lo hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de la protección de histonas (Anson y Bohr, 2000), el sistema de reparación es poco efectivo (Shen et al. 1995; Suter y Richter, 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte de electrones, uno de los principales sistemas de producción de ROS (Giulivi et al.

1995). Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona del ADN codificante y su repercusión suele ser, por tanto, más grave (Linnane et al. 1990; Ames et al. 1993).

1.3.4. CAMBIOS EN LOS COMPUESTOS OXIDANTES Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES CON EL ENVEJECIMIENTO

Con el envejecimiento tanto los oxidantes como los antioxidantes sufren alteraciones. En cuanto a la actividad SOD y CAT, se ha descrito tanto una disminución asociada a la edad (Guemouri et al. 1991; Tsay et al. 2000; Arranz et al. 2010a; Vida et al. 2011; Vida, 2016), como un aumento (Inal et al. 2001; Junqueira et al. 2004; Rizvi y Maurya, 2007), así como la ausencia de cambios en su actividad a lo largo de la edad (Alonso-Fernández et al. 2008). En cuanto al ciclo del glutatión, tanto el glutatión total como su forma reducida (GSH) disminuyen con el envejecimiento (Gil et al. 2006; Arranz et al. 2008; Alonso-Fernández et al. 2008; Arranz et al. 2010a; De la Fuente, 2018a). Además, su forma oxidada (GSSG) aumenta con la edad, hecho que ha sido observado tanto en leucocitos peritoneales de ratón, como en plasma y sangre periférica de humanos (Samiec et al. 1998; Gil et al. 2006; Arranz et al. 2010a). Este aumento de la forma oxidada junto con la disminución de la forma reducida en el envejecimiento, hace que el cociente GSSG/GSH, el cual es un buen indicador de estrés oxidativo (Kand'ar, 2016), se vea aumentado al avanzar la edad, lo que ha sido observado en leucocitos peritoneales de ratón y en plasma de humanos (Jones et al. 2002; De la Fuente et al. 2004b). En cuanto a los cambios asociados a la edad que experimentan las enzimas antioxidantes que forman parte del ciclo del glutatión, las enzimas GR y GPx, existe una gran controversia. Así, algunos autores sostienen que con la edad ambas enzimas aumentan sus actividades para paliar el daño oxidativo (Rodríguez-Martínez y Ruíz-Torres, 1992; Liu et al. 2004; Homma y Fujii, 2015), mientras que otros avalan la disminución de las mismas (Abraham et al. 1978; Glass y Gershon, 1984; Mo et al. 1995; Carlo y Loeser, 2003). Con respecto a la enzima pro-oxidante Xantina Oxidasa (XO), con la edad, su actividad aumenta, lo que ha sido observado tanto en plasma de sangre periférica humana (Aranda et al. 2007; Maté, 2015) como en diferentes órganos de ratas (Chung et al. 1999; Viña et al. 2000; Newaz et al. 2006; Aranda et al. 2007). También se ha observado este aumento con la edad tanto en leucocitos peritoneales como en otros tejidos de ratón (Arranz et al. 2010a; Vida et al. 2011; Vida, 2016). En cuanto a la variación con la edad del anión superóxido existen resultados contradictorios en las células inmunitarias, debidos en parte, a las diferentes condiciones experimentales en las que se ha valorado. Así, algunos autores han observado que la producción de anión superóxido tras la estimulación con péptido formilado (fMLP), la cual sería indicativa de la actividad microbicida de los fagocitos, se mantiene constante o aumenta

ligeramente al envejecer (Esparza et al. 1996; Lord et al. 2001; Alonso-Fernández et al. 2008), mientras que otros autores han descrito una disminución de la misma (Biasi et al. 1996; Tortorella et al. 2000; Izgüt-Uysal et al. 2003; Arranz et al. 2010a). Por el contrario, en cuanto a los niveles basales del anión superóxido en fagocitos, se ha visto que aumentan al envejecer en tejidos como cerebro, retina, hígado (Miyazaba et al. 2009), en leucocitos peritoneales y macrófagos de ratón (Vida et al. 2017), así como en neutrófilos en humanos (Alonso-Fernández et al. 2008).

No obstante, la mayoría de los cambios asociados a la edad tanto en compuestos oxidantes como antioxidantes, han sido estudiados de manera transversal, mediante la comparación de los mismos en individuos viejos respecto a individuos jóvenes. Por tanto, se hace necesario un abordaje longitudinal para demostrar que dichos cambios se deben al proceso de envejecimiento “per se”.

1.4. SISTEMA INMUNITARIO

1.4.1. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO

Desde que nacemos nos encontramos continuamente expuestos a padecer infecciones y procesos cancerígenos, frente a los cuales sucumbiríamos si no fuera porque disponemos del sistema inmunitario, el cual nos defiende tanto de microorganismos invasores extraños como de células propias malignizadas. Así, el sistema inmunitario está constituido por una gran variedad de células (leucocitos) y moléculas señalizadoras que van a ponerse en marcha para llevar a cabo la respuesta inmunitaria ante distintas amenazas y daños.

El sistema inmunitario, aunque diferenciado de forma clásica en Innato y Adquirido (también llamado inespecífico y específico, respectivamente), funciona de manera integrada para realizar su papel de defensa. La respuesta innata o inespecífica se desarrolla y actúa de forma indiscriminada e inmediata frente a cualquier agente extraño que consigue atravesar las barreras naturales de nuestro cuerpo (superficies epiteliales, como la piel o las mucosas del tracto respiratorio y digestivo) y frente a toda célula del organismo que se ha transformado en cancerígena. Esta respuesta es relativamente rápida (se desencadena en segundos y dura pocas horas) y va a ser llevada a cabo por una serie de células, entre ellas: los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos, así como las células dendríticas) y las células *Natural Killer* (NK) (o asesinas naturales). Pero además van a participar también toda una serie de factores solubles

entre los que destacan las proteínas del complemento, la lisozima, algunas citoquinas mediadoras de la inflamación y proteínas de fase aguda. Por tanto, esta respuesta constituye la primera línea de defensa ante lo extraño (Toche, 2012). Por un lado, las células fagocíticas siguen una serie de etapas en su proceso de ingestión y destrucción de agentes patógenos. En primer lugar, se adhieren a las paredes de los vasos o a los tejidos en los que se encuentren (adherencia), para posteriormente moverse de forma dirigida por el gradiente químico que se establece desde el foco infeccioso (quimiotaxis) y que les permite acercarse al mismo. Una vez que estas células llegan al foco infeccioso y contactan con los agentes extraños, se unen a ellos y los fagocitan (fagocitosis), incluyéndolos en vacuolas, fagosomas, iniciándose la etapa de destrucción de tales agentes. En esta etapa del proceso tienen lugar una serie de mecanismos, los más relevantes conllevan el aumento del consumo de oxígeno, la activación de la enzima NADPH oxidasa (Nox), y la consecuente producción de radicales libres, el primero de los cuales es el anión superóxido (O_2^-), que posteriormente dará lugar a otros radicales y ROS. La **Figura 2**, esquematiza las principales funciones llevadas a cabo por los fagocitos. Estas ROS permitirán procesar los microorganismos fagocitados para la posterior presentación de los determinantes antigénicos a los linfocitos T y de este modo poner en marcha la respuesta adaptativa o específica (Alberts et al. 2002).

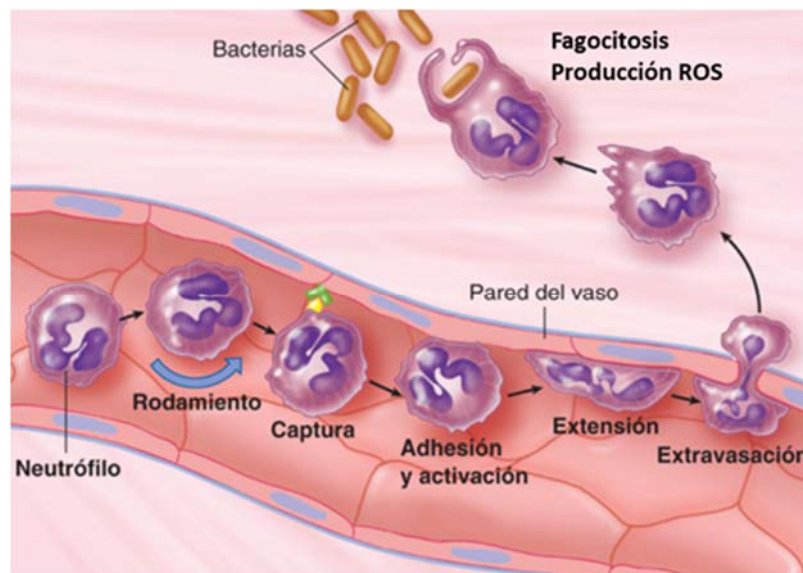


Figura 2. Esquema representativo de las funciones llevadas a cabo por los fagocitos. En primer lugar, el neutrófilo activado se va a adherir a la pared del endotelio vascular, tras lo cual, se produce la extravasación del mismo. Tras ello, se producirá la quimiotaxis o movilidad dirigida, a favor de un gradiente quimiotáctico, hacia el foco de infección. Una vez allí, tendrá lugar la fagocitosis de los microorganismos con la consecuente producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). (Fuente: modificado de Stuart Ira Fox. *Fisiología Humana 14ª edición. Capítulo 15: Sistema Inmunitario. Mc Graw Hill*).

Por otro lado, las células NK llevan a cabo su respuesta uniéndose directamente a las células tumorales haciéndolas entrar en apoptosis y produciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Dado que la puesta en marcha de esta inmunidad innata conlleva la liberación tanto de ROS como de citoquinas pro-inflamatorias pudiendo ser ambas extremadamente dañinas para el organismo, esta respuesta debe ser estrechamente regulada, ya sea a través de la apoptosis de las células involucradas o mediante el bloqueo mediado por antioxidantes y moléculas anti-inflamatorias (Finch et al. 2010). Normalmente, esta respuesta es suficiente para eliminar al agente invasor, pero otras veces se hace necesaria una respuesta más sofisticada, la respuesta adaptativa o específica, para acabar con ciertos antígenos.

El siguiente paso en la respuesta inmunitaria requeriría, por tanto, de la inmunidad adaptativa o específica, en la que intervienen principalmente los linfocitos T y B. Ambos tipos celulares son también capaces de adherirse al endotelio y extravasarse para migrar a favor de un gradiente quimiotáctico o señalizado por quimioquinas al sitio donde se encuentra el antígeno y tras el reconocimiento del mismo, se producirá la expansión clonal de estas células. La **Figura 3**, esquematiza las principales funciones llevadas a cabo por los linfocitos.

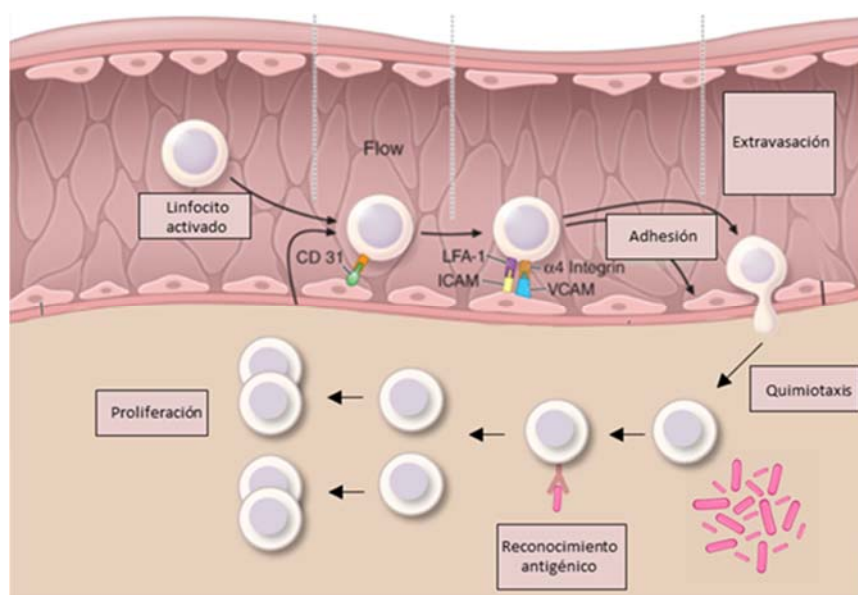


Figura 3. Esquema representativo de las funciones llevadas a cabo por los linfocitos. En primer lugar, el linfocito activado se va a adherir a la pared del endotelio vascular, tras lo cual, se produce la extravasación del mismo. Tras ello, se producirá la quimiotaxis o movilidad dirigida, a favor de un gradiente quimiotáctico, hacia el foco de infección. Una vez allí, y tras un correcto reconocimiento antigénico, se dará la proliferación de ese clon. (Fuente: modificado de Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th Edition. McGraw-Hill Education).

Los linfocitos B reconocen antígenos libres, mientras que los T, si son T CD4 o colaboradores (del inglés, *Helper: Th*), el antígeno tiene que ser presentado a través de una célula presentadora de antígeno (CPA), la cual puede ser una célula dendrítica, un fagocito y un linfocito B. Si son T CD8 o citotóxicos, van a reconocer cualquier célula diana que haya sido infectada o transformada en cancerígena. Tras el reconocimiento antigénico, se van a producir factores que permitirán su neutralización (mediante anticuerpos específicos que generan los linfocitos B tras su expansión clonal y transformación en células plasmáticas) o destrucción tras la activación y regulación de la respuesta inmunitaria (a través de las diferentes citoquinas liberadas por los linfocitos) (De La Fuente, 2018b). En el caso de los linfocitos T CD4 al activarse, podrán diferenciarse a Th1 o Th2, en función de las citoquinas que estén presentes en el momento del reconocimiento antigénico y que funcionan como terceras señales durante el proceso de activación. Así, la IL-12, especialmente, promueve la transformación en células Th1, las cuales llevarán a cabo respuestas de tipo celular, mientras que la IL-4 promueve la transformación en células Th2, que llevarán a cabo respuestas de tipo humoral. Esta división en 2 subtipos, se basó en el panel de citoquinas que éstos eran capaces de secretar una vez activados. Se denominó Th1 a los linfocitos secretores de IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ , IL-2 y Th2 a los linfocitos que liberan IL-4, IL-10, IL-6 e IL-13 (Mosmann y Sad, 1996).

En general, la inmunidad adquirida, con una duración de días a semanas destaca por su sistema de autorregulación perfectamente diseñado para evitar que la respuesta de activación que realiza frente a los antígenos se extienda en el tiempo y el espacio. Además, posee una gran especificidad, diversidad, capacidad de discriminación y dispone de memoria. Los linfocitos pueden reconocer, gracias a sus receptores específicos, millones de moléculas antigénicas diferentes con una gran especificidad. Al producirse los linfocitos (los B en la médula ósea y los T en el timo) se van dando toda una serie de combinaciones genéticas que permiten expresar en la membrana de los mismos, al madurar, millones de posibles receptores diferentes. Estos receptores (TCR en los linfocitos T y BCR, que son inmunoglobulinas de la clase M (IgM) en los B), distintos para cada uno de los millones de clones de linfocitos, reconocerán de forma muy específica a los millones de diversos antígenos con los que se pueda entrar en contacto a lo largo de la vida. Los linfocitos tienen memoria, gracias a la cual pueden recordar, cuando reconocen a un antígeno, si es la primera vez que entran en contacto con él, o si ya ha habido una interacción previa. Los linfocitos que nunca han contactado con un antígeno se denominan “vírgenes” y serán activados al entrar en contacto con el antígeno para el cual tienen el receptor específico para el mismo, lo que se traducirá en la proliferación de ese clon. Unos cuantos de esos linfocitos activados pasarán a ser “efectores” llevando a cabo la destrucción del antígeno,

mientras que otros pasarán a ser “memoria” y, a pesar de no actuar en esa ocasión, ante la reaparición de ese antígeno específico responderán más rápidamente y con mayor fuerza frente al mismo.

Aunque de forma tradicional se ha establecido la clasificación entre la inmunidad innata y la adquirida (esquemática en la **Figura 4**), actualmente se sabe que los límites y diferencias entre ambas ramas no son tan claros, sino que se van desdibujando en base a los nuevos descubrimientos. Por ejemplo, se han descubierto las denominadas células linfoides innatas (del inglés, “*innate lymphoid cells*”, ILC), las cuales, a pesar de ser un linaje linfóide, no responden de forma antígeno-específica, ya que carecen de receptores B y T. Además, se ha descubierto que células de la inmunidad innata, como las ILC y los macrófagos, también presentan memoria (Franceschi et al. 2017b). De hecho, actualmente se sabe que hay una memoria no antígeno específica que presenta la inmunidad innata y la adquirida. Otro ejemplo de la interconexión entre las dos respuestas, la innata y la adquirida, es el de la proteína HMGB1 (del inglés, “*high-morbidity group box*” 1). Esta proteína pertenece a las denominadas DAMPs (del inglés, “*damage-associated molecular patterns*”) y es liberada tras la muerte de la célula, siendo un ejemplo de molécula que no sólo dispara la respuesta innata y la inflamación, sino que también participa en la respuesta adaptativa (De la Fuente, 2018b).

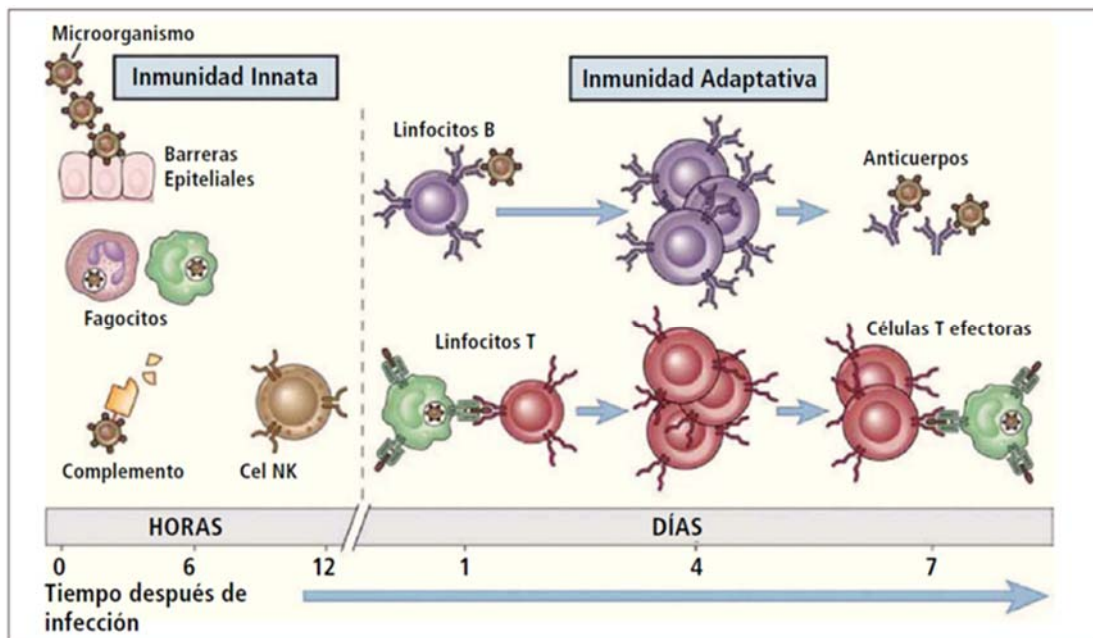


Figura 4. Esquema de la clasificación de los tipos celulares responsables de la respuesta inmunitaria innata y adquirida. Fuente: Toche P, 2012. Visión panorámica del Sistema Inmune. Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 23 (4): 364-507.

Cabe destacar también, la heterogeneidad que puede encontrarse en las respuestas inmunitarias frente a infecciones, tumores o vacunas en función del individuo. Esto es debido a que el sistema inmunitario, como consecuencia de la capacidad de memoria y plasticidad que presentan todos sus componentes, es capaz de recordar y adaptarse a todas las experiencias inmunológicas y los estímulos antigénicos a los que ha sido expuesto un individuo. Esto ha hecho que surja el término **inmunobiografía**, el cual engloba el tipo, la dosis, la intensidad, así como la secuencia temporal de exposición a distintos estímulos antigénicos a los que ha sido expuesto cada individuo ([Franceschi et al. 2017b](#)) y que condicionará por tanto su respuesta inmunitaria. Además, recientemente se ha comprobado que la estimulación del sistema inmunitario puede generar cambios epigenéticos que facilitan la reprogramación de las células, llegando, mediante el proceso de “transflamación”, a dar cambios en las diferenciaciones celulares (recogido en: [De la Fuente, 2018b](#)).

1.4.2. ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA INMUNITARIO: INMUNOSENESCENCIA

Con el envejecimiento, se ha descrito que el sistema inmunitario se modifica y deteriora dando lugar a un aumento en la susceptibilidad a infecciones y en la incidencia de enfermedades autoinmunes y cáncer ([Yancik y Ries, 1991](#); [Hirokawa et al. 1992](#)). De hecho, los procesos infecciosos son una de las principales causas de la elevada tasa de morbilidad y mortalidad en personas de edad avanzada, hecho que se atribuye a los cambios que sufren los componentes del sistema inmunitario con la edad, lo que se denomina inmunosenescencia ([Perskin y Cronstein, 1992](#); [Pawelec et al. 1995](#); [Pawelec, 2012](#)). La inmunosenescencia es un proceso que afecta a prácticamente todos los componentes celulares (monocitos/macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos) y no celulares (mediadores solubles o citoquinas) del sistema inmunitario innato y adaptativo ([Solana et al. 1999](#); [DelaRosa et al. 2006](#)). Lejos de ser un evento unidireccional, el sistema inmunitario experimenta una remodelación o reestructuración con la edad, donde algunas funciones se reducen, mientras que otras aumentan o se mantienen sin cambios ([Sanson et al. 2008](#); [De la Fuente y Miquel, 2009](#)). Además, es un proceso en continuo desarrollo que incluye complejas reorganizaciones y mecanismos compensatorios ([Globerson y Effros, 2000](#)).

1.4.2.1. Cambios en las poblaciones leucocitarias con la edad

Las variaciones asociadas a la edad tanto en el porcentaje como en el número de las poblaciones leucocitarias son parte de la remodelación que ocurre en las células del sistema inmunitario y es uno de los aspectos que ha sido mejor estudiado dentro de la inmunosenescencia. Todas las células del sistema inmunitario provienen de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, que proliferan y se diferencian dando lugar a las células del linaje mieloide (monocitos y leucocitos granulares, como son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y linfoide (linfocitos T, B y NK). El balance equilibrado entre la generación de ambos linajes, característico de individuos jóvenes, se pierde con el envejecimiento mostrándose una tendencia hacia los progenitores mieloides en detrimento de los linfoides ([Linton y Dorshkind, 2004](#); [Shaw et al. 2010](#)). Aunque los mecanismos subyacentes a esta alteración no son del todo conocidos, se ha demostrado que el nicho de las células madre hematopoyéticas puede jugar un papel fundamental en dicho sesgo ([Konieczny y Arranz, 2018](#)).

En general, se ha descrito que, al avanzar la edad, los componentes del linaje mieloide no experimentan, en general, reducciones en su porcentaje y número, hecho que sí sucede en el linfoide. Así, al envejecer, los fagocitos de sangre periférica, neutrófilos y monocitos, parecen no experimentar cambios en número ([Lord et al. 2001](#); [Ahluwalia et al. 2001](#); [Schroder y Rink, 2003](#)). A pesar de que no varían en número, sí que se han descrito cambios fenotípicos, como una mayor expresión de receptores por célula, lo que indicaría un mayor estado de activación de los mismos en personas mayores ([Globerson y Effros, 2000](#)). Los estudios respecto a macrófagos son menos frecuentes, pero se ha demostrado que, en ratones, el número de estas células no varía cuando se comparan animales adultos y viejos ([Herrero et al. 2002](#)). En los macrófagos peritoneales (CD11b+), hay trabajos de nuestro grupo de investigación que muestran una disminución con la edad, lo que se ha atribuido al aumento en la capacidad de adherencia de estas células a los tejidos peritoneales ([Puerto et al. 2005](#); [Arranz et al. 2010a](#)). Por otro lado, en cuanto a las células NK, se ha descrito un aumento progresivo en el número de las mismas, con la edad, en sangre periférica humana ([Solana et al. 1999](#); [Solana y Mariani, 2000](#); [Camous et al. 2012](#)), especialmente de aquellas con una expresión tenue del marcador CD56^{dim} que son las encargadas de la función citotóxica ([Almeida-Oliveira et al. 2011](#)).

De entre las distintas poblaciones leucocitarias, la que experimenta una reducción más drástica en número es sin duda la población de linfocitos T, debido a la involución tímica ([Huppert et al. 1998](#); [Boyd et al. 2013](#)). Sin embargo, no todas las subpoblaciones de linfocitos T se ven igualmente afectadas al envejecer; los linfocitos T CD4+, o bien no experimentan modificaciones

en su número, o disminuyen a edades muy avanzadas, mientras que los linfocitos T CD8+, según la mayoría de los investigadores, aumentan en número ([Huppert et al. 1998](#); [Krause et al. 1999](#); [Pawelec, 2012](#)). Por ello, la relación CD4+/CD8+ disminuye con la edad ([Pawelec, 2012](#)). Además, en ambas subpoblaciones de linfocitos T, las que disminuyen son las células vírgenes (CD45RA+) mientras que aumentan las células memoria (CD45RO+) ([Fagiolo et al. 1993](#); [Pawelec, 2012](#)), hecho que se ha relacionado con la exposición antigénica crónica a lo largo de toda la vida ([Franceschi et al. 2000b](#)). También en estas subpoblaciones se ha visto una pérdida de expresión del marcador CD28, esencial para la activación de las células T. Además, los linfocitos CD4+CD28- y CD8+CD28- son potentes secretores de citoquinas pro-inflamatorias ([Zanni et al. 2003](#)), por lo que contribuirían al estado de inflamación de bajo grado que ha sido descrito al envejecer.

Los linfocitos B y sus precursores medulares disminuyen con la edad, a pesar de que la médula ósea no involuciona al envejecer como lo hace el timo ([Frasca et al. 2003](#)). Además, las células pre-B muestran una menor capacidad para madurar hacia células B y una elevada susceptibilidad a la apoptosis ([Allman y Millar, 2005](#)). No obstante, el número de células secretoras de anticuerpos parece aumentar con la edad, especialmente las CD5+ que generan más autoanticuerpos ([Weksler, 2000](#)). De forma similar a lo que sucede con los linfocitos T, se ha descrito un aumento de los linfocitos B memoria y una disminución de los vírgenes al envejecer ([Colonna-Romano et al. 2006](#)).

A pesar de que son muchos los estudios que se han centrado en los cambios asociados a la edad en las distintas poblaciones leucocitarias, aún no se ha demostrado que exista una asociación directa entre número de células y funcionalidad. Por ejemplo, un aumento en el número de una subpoblación no implica una mejor funcionalidad de esas células, sino más bien lo contrario. De hecho, el aumento en el número de células CD3-CD56+NK al envejecer, ha sido explicado como un mecanismo compensatorio dada la pérdida de funcionalidad de estas células con el envejecimiento ([Solana y Mariani, 2000](#), [Hazeldine et al. 2013](#)). Por tanto, dado que lo que es importante para el mantenimiento de la salud es la eficacia de la respuesta inmunitaria, independientemente del número de células que participen en la misma, estudiar los cambios asociados a la edad en parámetros funcionales del sistema inmunitario es de mayor relevancia.

1.4.2.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad

La “remodelación” que experimenta el sistema inmunitario con el envejecimiento, se aprecia de forma más relevante en la capacidad funcional de sus células. Así hay determinadas funciones que aumentan, otras disminuyen y otras apenas se modifican ([Pawelec et al. 1995; 2002a; De La Fuente y Miquel, 2009; Desai y Landay, 2010; Agarwal y Busse, 2010; Arranz et al. 2010; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011](#)).

En lo que respecta a las células que llevan a cabo la respuesta inmunitaria innata, a pesar de que en el pasado se consideraba que no contribuían al deterioro inmunitario de la vejez, las aportaciones de esta última década desmienten esta idea, habiéndose observado que experimentan cambios funcionales importantes con el envejecimiento ([Shaw et al. 2010; Hajishengallis, 2010](#)). En el caso de los fagocitos, hay trabajos que indican que la función de los mismos está preservada con la edad, mientras que otros muestran cambios en casi todas las funciones de estas células, disminuyendo algunas al envejecer y aumentando otras ([Lord et al. 2001; De la Fuente et al. 2004a; 2004b; Aw et al. 2007; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al. 2010a; Wessels et al. 2010; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011](#)).

Los neutrófilos de sangre periférica son las primeras células que llegan al sitio de infección para eliminar directamente a los microorganismos invasores, siendo tanto su activación como su reclutamiento en los tejidos periféricos, fundamentales para la defensa del organismo ([Shaw et al. 2010](#)). Así, la pérdida progresiva de la funcionalidad de los neutrófilos se considera una causa fundamental del aumento de morbilidad y mortalidad debido a las infecciones que tienen lugar en las últimas décadas de vida ([Tortorella et al. 2000; 2001](#)). Aunque hay resultados contradictorios, en general se acepta que los neutrófilos muestran una mayor adherencia, una menor quimiotaxis y capacidad fagocítica, así como alteraciones en la actividad microbicida al aumentar la edad ([Alonso-Fernández et al. 2008; 2010](#)). En este último aspecto, se ha descrito en individuos de edades avanzadas una menor desgranulación de enzimas líticas en respuesta a un péptido de las membranas bacterianas, como lo es el péptido formilado (fMLP). Por otro lado, la producción de radicales libres como el anión superóxido se ha visto aumentada, disminuida o sin cambios ([Alonso-Fernández et al. 2008; Simell et al. 2011; Tsukamoto y Machida, 2012; Maté, 2015](#)).

En otras células fagocíticas, como los macrófagos, también se han descrito unos cambios funcionales similares al envejecer ([De la Fuente y Miquel, 2009; Alonso-Fernández y De la Fuente, 2011; Arranz et al. 2010a; Maté, 2015; Vida et al. 2017](#)). Concretamente, los macrófagos suponen una población muy heterogénea, tanto funcional como fenotípicamente, lo cual parece

deberse a la gran capacidad que presentan para adaptarse a los cambios en el microambiente que les rodea (Stout y Suttles, 2005). Los macrófagos se clasifican como M1 (activados de forma clásica) o M2 (activados de forma alternativa) en función del papel que juegan en los procesos inflamatorios (Gordon, 2003). Por un lado, los macrófagos M1 producen mediadores pro-inflamatorios que incluyen citoquinas y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y funcionan en la defensa del huésped. En cambio, los macrófagos M2 desempeñan un papel contrarrestando la inflamación y promoviendo la cicatrización de heridas (Gordon, 2003). En este sentido, se ha descrito que, al envejecer, tiene lugar un cambio en la polarización de los macrófagos de anti-inflamatorios M2 a pro-inflamatorios M1 (Oishi y Manabe, 2016).

Por otro lado, las alteraciones funcionales que experimentan las células NK con la edad pueden contribuir a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas y procesos cancerosos (Albright et al. 2004; Le Garff-Tavernier et al. 2010). De hecho, la actividad NK es uno de los parámetros que más se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer infecciones y con el aumento de la mortalidad en la vejez, tanto en los seres humanos como en ratones (Ogata et al. 2001; Aw et al. 2007). Así, se ha descrito que la actividad citotóxica por célula disminuye claramente en la vejez (Arranz et al. 2008; 2010a; Maté, 2015; Aw et al. 2007), hecho que podría deberse a los cambios en las concentraciones de citoquinas circulantes como la IL-2, en respuesta a la cual las células NK no sólo aumentan su actividad citotóxica, sino que también proliferan y liberan otras citoquinas como IFN-gamma e IL-8 (Waldmann, 2006).

Los linfocitos T, además de ser las células más estudiadas en el contexto de la inmunosenescencia, son también las que experimentan en mayor medida el deterioro funcional como consecuencia del envejecimiento (Pawelec, 2012). Una de las funciones más destacadas de las células T es su proliferación en respuesta a un antígeno o expansión clonal. Son muchos los estudios que demuestran que la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos va disminuyendo de forma significativa durante el envejecimiento, tanto en humanos como en animales de experimentación (Pawelec et al. 2002a; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al. 2008; 2010a). Este deterioro en la proliferación y también en la producción de IL-2 al envejecer, es específico de las células T vírgenes y no se ha observado en las células T memoria (Adolfsson et al. 2001). Es interesante destacar el hecho de que una menor proliferación y secreción de IL-2, junto con un alto porcentaje de CD8+, se han propuesto como marcadores predictivos de mortalidad (Ferguson et al. 1995; Pawelec et al. 2002b). Como paso previo a la proliferación, los linfocitos deben adherirse al endotelio y a los tejidos para migrar al sitio de reconocimiento antigénico. Así, se ha descrito un aumento de la adherencia, así como una mayor expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T al envejecer (De Martinis et al. 2000).

No obstante, la capacidad de migrar hacia el sitio de reconocimiento antigénico (quimiotaxis) disminuye al envejecer ([De La Fuente y Miquel, 2009](#); [Arranz et al 2010a](#); [Huang et al. 2011](#)).

Actualmente, se piensa que estos cambios son debidos a múltiples factores, entre los que, intervienen las alteraciones en las células madre precursoras de estos linfocitos, las que aparecen en el microambiente tímico, los cambios en las subpoblaciones y en la expresión de marcadores de superficie antes comentados, la mayor susceptibilidad a la apoptosis y las variaciones en la señalización intracelular que se genera tras la unión de los ligandos a los correspondientes receptores de las células T. En este sentido, se ha comprobado que al envejecer hay una disminución en la formación de inositol trifosfato (IP3) y de diacilglicerol (DAG), alteraciones en las isoformas de la fosfolipasa C (PLC) y de distintas quinasas implicadas en estas vías de señalización ([Pawelec et al. 2002a; 2012](#)). En lo que respecta a la atrofia tímica ([Lynch et al. 2009](#)), hecho que sucede a una edad bastante temprana, se han propuesto muchas teorías, aunque ninguna de ellas ha sido completamente aceptada. Sin embargo, hay datos que indican que dicha atrofia no impediría el total funcionamiento de este órgano, e incluso que unas adecuadas células T maduras pueden mantener su integridad en la vejez. No obstante, el conservar el timo más allá de la edad reproductora es para algunos investigadores un lujo innecesario, puesto que ya se dispone de las células T memoria que se requieren para responder a los posibles antígenos con los que se enfrentará el individuo en lo que le queda de vida. Además, al envejecer hay un elevado número de células T que se diferencian extratímicamente, lo que puede ser un excelente mecanismo compensatorio ante la atrofia tímica.

Por el contrario, los linfocitos B han sido mucho menos estudiados en cuanto a las alteraciones funcionales que experimentan con la edad, pero también experimentan cambios con el envejecimiento ([Ademokun et al. 2010](#)). Los cambios funcionales de las células B parecen ser debidas en gran parte a la deficiente colaboración por parte de las T ([Malaguarnera et al. 2001](#)). Una clara manifestación del deterioro de la respuesta inmunitaria humoral al envejecer es la deficiente generación de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación en ancianos ([Song et al. 1999](#); [Ongradi y Kovesdi, 2010](#)). La capacidad proliferativa de los linfocitos B, al igual que pasa con los T, está disminuida en la vejez ([Frasca et al. 2003](#)), pero se ha descrito un aumento de inmunoglobulinas circulantes, especialmente de autoanticuerpos ([Weksler, 2000](#)).

Por otro lado, las modificaciones con la edad en las citoquinas que producen y liberan las diferentes células inmunitarias son también un aspecto importante que ha sido ampliamente examinado con el fin de dilucidar posibles mecanismos responsables de la inmunosenescencia. Hay que tener en cuenta que las citoquinas regulan la función inmunitaria, desempeñando un

papel fundamental tanto en su iniciación como en etapas efectoras. Uno de los cambios más aceptados que ocurren con la edad es el de la relación de citoquinas de tipo Th1/Th2. Con el envejecimiento se produce un cambio pasando de una respuesta predominantemente Th1 a una predominantemente Th2 (Shearer, 1997; Alberti et al. 2006), hecho que conlleva la disminución de citoquinas tipo Th1 como IL-2, IL-12 o IFN- γ (Pawelec et al. 2002a; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al. 2010b; Bauer y De La Fuente, 2016), y el aumento de citoquinas tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-6 o IL-8, aunque hay estudios que muestran resultados contrarios. Esta controversia en cuanto a los cambios que experimentan las diferentes citoquinas al envejecer puede deberse a los distintos contextos fisiológicos en los cuales se valoren esas citoquinas. De tal forma que el papel y significado no será el mismo si éstas son medidas en plasma en condiciones basales o en plasma tras estimulación de la sangre, y también si son medidas en cultivos de células inmunitarias aisladas en condiciones basales o tras la adición de distintos mitógenos (Maté, 2015). Además, este aumento de las citoquinas más implicadas en la respuesta humoral y en la inflamación (tipo Th2) al avanzar la edad, podría explicar la mayor susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Por otro lado, la menor presencia de citoquinas implicadas en la respuesta celular (Th1) podría ser la base de la pérdida de la respuesta frente a infecciones y al desarrollo tumoral que se da en el envejecimiento.

Otro de los cambios que han sido ampliamente documentados al envejecer es el aumento de las citoquinas pro-inflamatorias (como el TNF- α o la IL-6) y la disminución de anti-inflamatorias, como la IL-10 (Pawelec et al. 2002a; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al. 2010b). De hecho, el aumento de los compuestos pro-inflamatorios al avanzar la edad, hizo que surgiese el término “*inflammaging*” (Franceschi et al. 2000a), el cual se ha relacionado también con la aparición de múltiples enfermedades asociadas a la edad (Franceschi y Campisi, 2014; Xia et al. 2016; Franceschi et al. 2018).

La **Figura 5**, esquematiza los principales cambios asociados al proceso de envejecimiento del sistema inmunitario que han sido descritos. No obstante, la mayoría de los cambios asociados a la edad en cuanto a los parámetros funcionales del sistema inmunitario, así como en la red de citoquinas, han sido estudiados de manera transversal, mediante la comparación de los mismos en individuos viejos respecto a individuos jóvenes, o en el caso de humanos de forma longitudinal pero sólo durante unos años. Por tanto, se hace necesario el estudio de los mismos desde la edad adulta y hasta la muerte de cada individuo, mediante un abordaje longitudinal que únicamente puede hacerse en ratones, para arrojar luz en la compleja remodelación y reestructuración que experimenta el sistema inmunitario al envejecer.

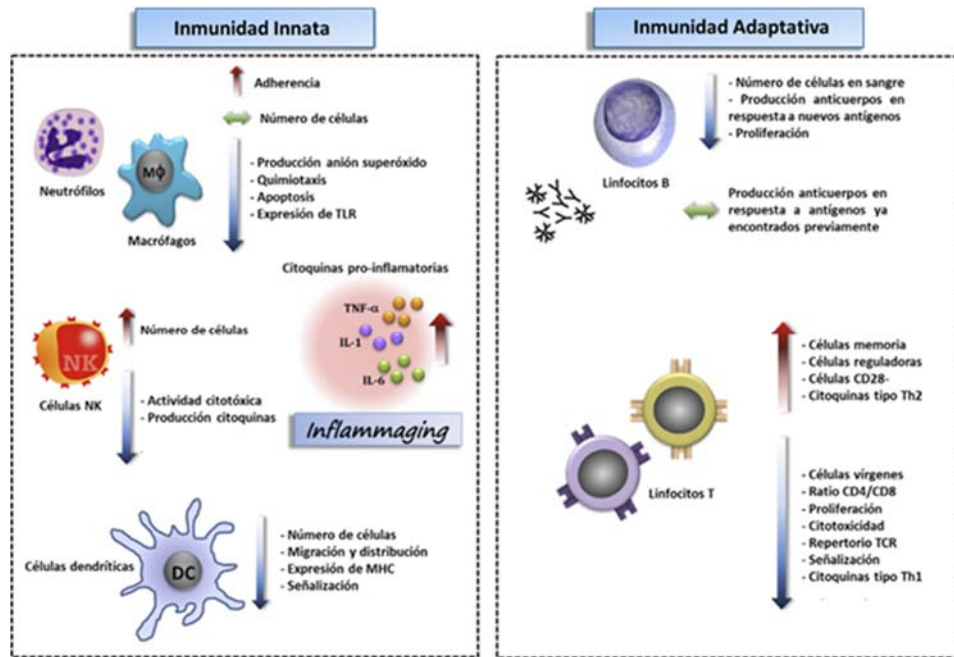


Figura 5. Resumen de los principales cambios asociados al envejecimiento del sistema inmunitario. (Fuente: modificado de Bauer and De La Fuente, 2016. *The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. Mech Ageing Dev.* 2016 Sep;158:27-37)

1.5. LA TEORÍA DE LA OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN DEL ENVEJECIMIENTO

Teniendo en cuenta todo lo mencionado hasta el momento, la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009) surgió para proporcionar una visión algo más completa e integradora de los procesos más relevantes implicados en el envejecimiento. En esta teoría se aúnan el estrés oxidativo asociado al proceso de envejecimiento (Harman, 1956; Barja, 2002) con el inflamatorio que también caracteriza a este proceso y que hizo que surgiese el término “*inflammaging*” (Franceschi et al. 2000a), considerando la idea, cada vez más aceptada de que la oxidación y la inflamación son procesos íntimamente relacionados (Sarkar y Fisher, 2006; Salminen et al. 2008; Cannizzo et al. 2011; Vida et al. 2014; De La Fuente, 2018a). Además, esta teoría introduce el concepto de la participación del sistema inmunitario en la mayor o menor oxidación-inflamación que aparece al envejecer. Así, el envejecimiento sería consecuencia de un estrés oxidativo crónico, asociado a un estrés inflamatorio, que causaría el deterioro funcional de todas las células del individuo, pero tendría un mayor impacto en las de los sistemas homeostáticos, esto es, las del nervioso, endocrino e inmunitario, lo que explicaría la menor capacidad de mantener la homeostasis que tiene lugar al envejecer y que conlleva una mayor morbilidad y mortalidad. Dado que las células del sistema inmunitario necesitan producir

compuestos oxidantes e inflamatorios para llevar a cabo su función defensiva, si este hecho no está bien controlado, pueden ser responsables de la generación de un estrés oxidativo-inflamatorio que no sólo causaría su propio deterioro funcional (inmunosenescencia), sino que también podría aumentar ese estrés en el organismo, acelerando el proceso de envejecimiento. En ese círculo vicioso de oxidación-inflamación que puede generar el sistema inmunitario al envejecer, estaría implicado, entre otros factores, el factor de transcripción NF- κ B. La **Figura 6**, esquematiza los conceptos más relevantes de esta teoría.

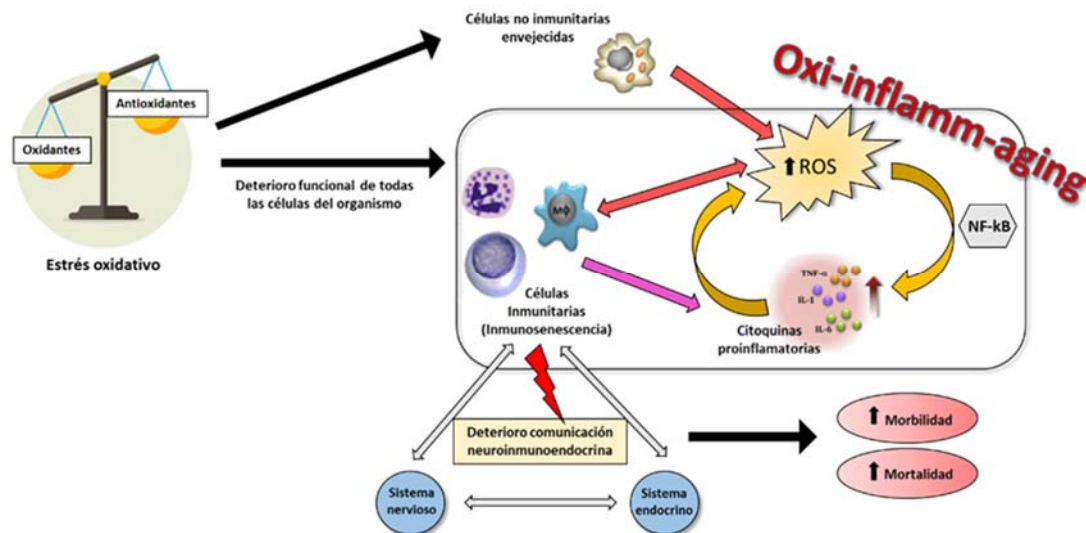


Figura 6. Esquema representativo de la teoría de la oxidación e inflamación. (Fuente: modificado de Bauer and De La Fuente, 2016. *The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. Mech Ageing Dev.* 2016 Sep;158:27-37)

Así, esta teoría sugiere que el estado funcional del sistema inmunitario puede incidir en la velocidad de envejecimiento del individuo (De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2018a). De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que una serie de estrategias de estilo de vida como una adecuada nutrición, la práctica de ejercicio físico y mental, así como el mantenimiento de unas relaciones sociales adecuadas, que se traducen en una mejora de las funciones inmunitarias, conllevan a su vez un aumento de la longevidad media en ratones.

1.6. EL CONCEPTO DE EDAD BIOLÓGICA

El hecho de que el proceso de envejecimiento sea universal, afectando a todos los individuos, no quiere decir que tenga lugar a la misma velocidad en todos ellos. De hecho, otra de las principales características del envejecimiento es su gran heterogeneidad. Esta heterogeneidad

es patente a nivel intra-individual, de manera que no todos los órganos y tejidos de un mismo individuo envejecen a la misma velocidad, pero también se manifiesta a nivel inter-individual, de forma que no todos los individuos de una población con idéntica edad cronológica, están envejeciendo a la misma velocidad. En base a este hecho, surge el concepto de edad biológica, la cual pretende estimar la velocidad a la que está envejeciendo un individuo y, por tanto, es más indicativa que la edad cronológica, tanto del estado de salud como de la esperanza de vida de cada individuo.

Pese a su simple definición, el problema de la edad biológica es su cuantificación. Para poder determinar la edad biológica es necesaria la utilización de marcadores biológicos o “biomarcadores”, los cuales pueden ser parámetros psicológicos, fisiológicos o bioquímicos que experimenten cambios con la edad. Sin embargo, esta condición, aunque necesaria, no es suficiente para que dicho parámetro pueda ser utilizado para determinar la edad biológica. Además, es necesario que dichos cambios tengan como consecuencia un efecto beneficioso o perjudicial en la salud del individuo. Por ejemplo, la aparición de canas o la calvicie se asocian positivamente con la edad, de forma que cuanto mayor es la edad cronológica, mayor es la presencia de canas o de calvicie. En cambio, el hecho de que un individuo en la edad adulta tenga canas o presente calvicie, no quiere decir que esté envejeciendo a una mayor velocidad. Por tanto, para que un parámetro pueda ser utilizado como marcador de edad biológica tiene que además cumplir dos requisitos: el primero es que dicho parámetro tiene que presentar valores preservados en individuos longevos, ya que éstos han logrado alcanzar edades tan avanzadas debido a que presentan un envejecimiento saludable; y el segundo es que aquellos individuos adultos que tengan dicho parámetro con valores propios de sujetos cronológicamente más viejos, deben presentar una menor longevidad.

Dado el valor predictivo de longevidad que tiene la edad biológica, han sido muchos los estudios llevados a cabo centrados en la identificación de biomarcadores que permitan su determinación. En este sentido, diversos parámetros fisiológicos (función respiratoria, presión arterial sistólica, hematocrito...), bioquímicos (albúmina, colesterol, urea...), genéticos (longitud telomérica) y epigenéticos (metilación del ADN) han sido propuestos para tal fin ([Confort, 1969](#); [Benfante et al. 1985](#); [Nakamura y Miyao, 2007](#); [Bae et al. 2008](#); [Bulpitt et al. 2009](#); [Horvath, 2013](#); [Srettabunjong et al. 2014](#); [Belsky et al. 2015](#), [Gao et al. 2019](#)). Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han tenido en cuenta parámetros de función y estrés oxidativo e inflamatorio en células inmunitarias. Como se ha comentado anteriormente, y se hará en el siguiente apartado, el funcionamiento del sistema inmunitario se ha postulado como un excelente marcador de salud ya que ciertos parámetros de función inmunitaria han sido relacionados con la longevidad

mientras que otros han sido relacionados con la mortalidad. Por tanto, se hace necesaria la profundización en la investigación de marcadores de función, estrés oxidativo e inflamatorio en células inmunitarias que resulten de utilidad para determinar la edad biológica.

1.7. EL SISTEMA INMUNITARIO COMO MARCADOR DE EDAD BIOLÓGICA Y PREDICTOR DE LONGEVIDAD

Como ya ha sido comentado, a medida que la esperanza de vida media de la población crece, aumenta, a su vez, la vulnerabilidad a diversas patologías, especialmente a las infecciosas, en términos de incidencia y severidad ([Tarazona et al. 2002](#)). Este hecho, que tiene lugar debido a la remodelación del sistema inmunitario con el envejecimiento, junto con la observación de que una inmunidad deteriorada está asociada a un aumento de la mortalidad en personas mayores, ha llevado a demostrar que el sistema inmunitario no es sólo un excelente marcador de salud, sino también de longevidad ([Wayne et al. 1990](#)). Así, en las últimas dos décadas, los inmunogerontólogos están tratando de identificar cuáles de las múltiples alteraciones de los parámetros inmunitarios hasta ahora descritos están causalmente relacionados con un estado de salud clínicamente desfavorable, con el fin de conocer los mecanismos que subyacen a la inmunosenescencia, e intervenir para restablecer una inmunidad adecuada con los beneficios que ello conlleva: una mayor longevidad saludable. Esto supone un enorme reto ya que requiere estudios longitudinales en especies de larga vida, como es la nuestra ([Derhovanessian et al. 2009](#)).

Uno de los estudios más importantes del área de la inmunogerontología, el estudio OCTO, fue llevado a cabo en una gran cohorte de personas suecas de 86-92 años de manera longitudinal. En él, los individuos fueron seleccionados independientemente de su estado de salud (sólo el 9% reunían los criterios para ser incluidos en el protocolo SENIEUR) ([Wikby et al. 1994](#)), observando que aquellos sujetos que mostraban una baja respuesta proliferativa de los linfocitos T frente a Con A, junto con un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+, y bajos niveles de linfocitos T CD4+ y CD19+, mostraban una menor longevidad ([Ferguson et al. 1995](#)). El seguimiento de los individuos de este estudio, posteriormente, dio lugar al estudio NONA donde se describió un fenotipo de riesgo inmunitario (del inglés, “*Immune Risk Phenotype*”: IRP) definido por: un número alto y bajo de linfocitos CD8+ y CD4+, respectivamente, un bajo cociente CD4/CD8, una respuesta linfoproliferativa pobre en respuesta a IL-2, un aumento en el número de células CD8+CD28-CD27- y altas concentraciones de anticuerpos frente a

citomegalovirus (Wikby et al. 2002). Así, estos parámetros, conjuntamente, estarían asociados con un mayor riesgo de mortalidad, y, por lo tanto, predecirían la mortalidad de dichos sujetos estudiados. Además, como prueba de validación del IRP, se ha demostrado que los centenarios no cumplen ninguna de estas condiciones (Strindhall et al. 2007).

Sin embargo, este perfil de riesgo inmunitario no contempla parámetros asociados con la inflamación sistémica que tiene lugar en los individuos al avanzar la edad. Sin embargo, muchos investigadores han descrito una asociación entre niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-6 y mortalidad (Franceschi et al. 2000b; Bruunsgaard et al. 2003b; Caruso et al. 2004). También, Bruunsgaard y colaboradores (2003a) demostraron que los niveles plasmáticos de TNF- α servían como indicador de fragilidad y marcador predictivo de longevidad en individuos longevos. Se hace necesario destacar el hecho de que la medición de estas citoquinas se realiza en condiciones basales, por lo que serían indicativas de una inflamación estéril (Bauer y De La Fuente, 2016), la cual pone de manifiesta la sobreactivación del sistema inmunitario en ausencia de estímulo, lo que tendría graves consecuencias para el individuo.

En cambio, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células inmunitarias en respuesta a un estímulo, la cual es necesaria para acabar con el mismo, también ha sido relacionada con la mortalidad. Así, Van den Biggelaar y colaboradores (2004) describieron que los participantes de 85 años de edad que tras una estimulación con LPS producían niveles bajos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , pero también de otras anti-inflamatorias, como IL-10, mostraban dos veces más riesgo de mortalidad en comparación con los sujetos que respondían con mayores niveles de citoquinas pro- y/o anti-inflamatorias.

También se ha descrito que una serie de microARNs circulantes, los cuales disminuyen significativamente con la edad, están asociados con la regulación de vías inflamatorias. Además, recientemente se ha descrito que los individuos octogenarios tienen deteriorada la ruta de generación de microARNs mientras que los centenarios la tienen similar a los individuos adultos (Borrás et al. 2017). Esto sugiere que el correcto mantenimiento de la regulación mediada a través de microARNs es fundamental para alcanzar una elevada longevidad. Por tanto, dichos marcadores representan una herramienta de diagnóstico poco invasivo, que hace que puedan ser también utilizados como marcadores biológicos del envejecimiento, dado su implicación en la regulación de la inflamación y, por ende, en la longevidad (Serna et al. 2012; Noren Hooten et al. 2013).

A pesar de la importancia del mantenimiento de un adecuado estado redox para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario, el estudio de marcadores de estrés oxidativo en células

inmunitarias como marcadores de longevidad ha sido escasamente estudiado. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que ciertos parámetros de estrés oxidativo, medidos en orina, son altamente predictivos de todas las causas de mortalidad ([Gao et al. 2019](#)), y que individuos centenarios y su descendencia presentan una mayor resistencia en sus células inmunitarias al daño oxidativo, que la que presentan individuos viejos ([Sizzano et al. 2018](#)).

Por otro lado, los parámetros funcionales del sistema inmunitario innato, han sido menos investigados como marcadores de la velocidad de envejecimiento, ya que se creía que su contribución al proceso de envejecimiento era mínima. Sin embargo, en primer lugar, ambos tipos de inmunidad no deben ser estudiados de forma aislada ya que el correcto funcionamiento de la respuesta inmunitaria innata influye en la respuesta adaptativa de muchas maneras. En primer lugar, la mayoría de los fagocitos son células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) que específicamente van a activar a las células del sistema adaptativo, y, en segundo lugar, las moléculas producidas por las células del sistema innato determinarán el tipo, la intensidad y duración de la respuesta inmunitaria adaptativa ([Fulop et al. 2017](#)). Además, estudios también recientes han demostrado que los fagocitos, serían los principales contribuyentes al aumento de la oxidación e inflamación que tiene lugar al envejecer ([Vida et al. 2017](#)) y, consecuentemente, los más responsables de la velocidad de envejecimiento.

Por todo lo indicado, es entendible la necesidad de profundizar en el estudio de marcadores del sistema inmunitario, incluyendo funciones tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, además de parámetros inflamatorios y de estado redox en células inmunitarias, que puedan ser utilizados como predictores de longevidad. Además, un hecho que no ha sido tenido en cuenta a la hora de proponer marcadores de esta predicción es que los mismos pueden variar dependiendo de la edad del individuo. Por tanto, se hace necesario también investigar qué parámetros de los comentados pueden resultar ser predictivos de longevidad a cada edad. Por último, y dado que la determinación de un único marcador no puede ser usada como predictor de esperanza de vida ([Pignolo, 2019](#)), se requiere llevar a cabo modelos matemáticos que seleccionen y combinen aquellos parámetros con mayor fuerza predictiva.

1.8. ENVEJECIMIENTO Y FRAGILIDAD

Etimológicamente hablando, el término frágil proviene del latín “*fragilis*” que significa que se rompe con facilidad ([Afilalo, 2011](#)). Así, la fragilidad se ha definido como “un estado fisiológico caracterizado por un aumento de la vulnerabilidad a las agresiones externas, como resultado de

una disminución de las reservas fisiológicas de múltiples sistemas, lo cual origina dificultades para mantener la homeostasis” (Fried et al. 2001). Esto hace que la persona frágil sea altamente vulnerable a estresores, debido a una alteración en múltiples sistemas y en sus interrelaciones, lo que conduce a una disminución de la capacidad de adaptación del organismo (Bergman et al. 2007). De este modo, cuando un individuo frágil se enfrenta a una situación mínima de estrés, éste puede resultar en hospitalización, discapacidad e incluso muerte (Cawthon et al. 2007). De hecho, la fragilidad se ha descrito como un estado previo a la discapacidad (Rodríguez Mañas et al. 2009; Robles Agudo et al. 2012; Palliyaguru et al. 2019).

Son muchas las escalas que se han propuesto para determinar la fragilidad de un individuo. Sin embargo, a día de hoy, los cinco criterios establecidos por Fried en el 2001 son los más utilizados en el ámbito clínico, dada la facilidad de determinación de los criterios que contempla. De este modo, Fried y colaboradores definieron la fragilidad de acuerdo a la presencia de al menos 3 de los 5 criterios descritos a continuación:

- Pérdida de peso involuntaria en el último año (mínimo 4,5kg o >5%).
- Sentirse exhausto y con agotamiento general. Información proporcionada por el paciente.
- Disminución de la fuerza de prensión (medida con un dinamómetro).
- Lentitud de la marcha (basándose en una distancia de 4,6 metros).
- Bajo nivel de actividad física.

Así, los individuos que no cumplen ninguno de estos criterios son considerados robustos, no frágiles o vigorosos, si cumplen 1 o 2 de estas condiciones, son considerados pre-frágiles y los que cumplen tres o más de tres, son considerados frágiles.

Si bien el envejecimiento y la fragilidad están estrechamente relacionados, no necesariamente se solapan. A pesar de que ambos procesos tienen como base la pérdida del mantenimiento de la homeostasis al envejecer, se ha propuesto que mientras que en el envejecimiento el fallo homeodinámico es global, en la fragilidad el fallo homeodinámico gira en torno al metabolismo energético y los cambios neuromusculares (Fedarko et al. 2011). De este modo, mientras que algunas personas de edad avanzada cumplen 3 o más de estos criterios (sería en torno al 10-15% de la población), otros individuos envejecidos disfrutan de un excelente nivel de capacidad funcional, rendimiento biológico e independencia social, definidos como robustos o vigorosos. Por lo tanto, el perfil de fragilidad está sujeto a la acumulación de déficit, y la carga de más o menos déficit determinará el tiempo restante hasta la muerte del sujeto, por lo que la fragilidad actuaría como un estimador de edad biológica (García-García et al. 2011). De hecho, gracias a

estudios longitudinales se ha demostrado que la fragilidad es un factor de riesgo no solo para la discapacidad y la hospitalización, sino también para la mortalidad ([Fried et al. 2001](#); [Cawthon et al. 2007](#); [Avila-Funes et al. 2008](#); [Ensrud et al. 2009](#)). Dada la estrecha relación que parece existir entre el carácter frágil y el envejecimiento, desde su desarrollo muchos estudios han intentado profundizar en el conocimiento tanto de la aparición como de la evolución de la fragilidad, siendo éste un desafío en la investigación gerontológica básica. No obstante, aún son bastante desconocidos los mecanismos subyacentes que conducen al establecimiento de este carácter frágil.

Este desconocimiento es debido, entre otras causas, a la ausencia de este tipo de estudios en animales de experimentación, como los roedores ([Kane et al. 2016](#); [Banga et al. 2019](#)). Hasta hace pocos años, la fragilidad era un término exclusivo del ser humano, de manera que no existía ningún índice a través del cual poder evaluar dicho carácter en modelos animales. No obstante, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar modelos animales que mimeticen aspectos característicos de la fragilidad humana ([Walston et al. 2008](#); [Banga et al. 2019](#); [Palliyaguru et al. 2019](#)) y se han desarrollado una serie de índices para evaluar la fragilidad en roedores ([Parks et al. 2011](#); [Rockwood et al. 2017](#); [Antoch et al. 2017](#)). El problema de estos índices, es que incluyen parámetros que no son directamente extrapolables a humanos. Por ello, se desarrolló el “Test Valencia” para ratones, el cual adapta los mismos criterios de fragilidad propuestos por Fried para humanos, a estos animales ([Gómez-Cabrera et al. 2017](#)). Entre las ventajas que muestra este test se encuentra la comodidad de realización, así como la facilidad de extrapolación al humano, dado que ambos test comparten los mismos parámetros. Sin embargo, en el estudio de [Gómez-Cabrera y colaboradores](#) no se investigó la relación entre la puntuación de fragilidad obtenida en ratones y la mortalidad. Además, sólo se realizó en ratones viejos (a partir de 17 meses de edad) y sólo en machos de la cepa C57/BL6. Dado que el deterioro asociado a la edad de los sistemas fisiológicos no tiene lugar a la misma velocidad en todos los individuos de una población de idéntica edad cronológica, puede ser que el carácter frágil pueda ser detectado en edades más tempranas. Por tanto, se hace necesaria la validación del “Test Valencia” como índice de fragilidad en ratones, mediante su investigación de manera longitudinal a distintas edades incluyendo la edad adulta, así como la investigación de su capacidad predictiva de mortalidad.

1.9. EL ENVEJECIMIENTO SALUDABLE: INDIVIDUOS QUE ALCANZAN UNA ELEVADA LONGEVIDAD

Los centenarios, que se caracterizan por haber sobrevivido a las enfermedades asociadas a la edad responsables de la elevada morbilidad y mortalidad del envejecimiento, y de haber llegado al límite extremo de la vida en buenas condiciones clínicas, representan un modelo idóneo para estudiar los mecanismos subyacentes al proceso de envejecimiento ([Cossarizza et al. 1997](#); [Pignolo, 2019](#)). Así, estos individuos, no sólo escapan de las infecciones típicas de las personas mayores, sino que también muestran una resistencia peculiar contra el cáncer. Además, otras enfermedades como las cardiovasculares, la demencia, la diabetes y las cataratas, son menos comunes en los centenarios que en personas de 70-80 años de edad ([Cossarizza et al. 1997](#); [Bonafè et al. 2002](#); [Moroni et al. 2005](#); [Galioto et al. 2008](#); [Pignolo, 2019](#)).

Son muchos los estudios que demuestran una función inmunitaria, tanto en su vertiente innata como en la adaptativa, relativamente intacta en un porcentaje alto de centenarios ([Mocchegiani y Malavolta, 2004](#)), lo que podría explicar su elevada longevidad. Así, en cuanto a la capacidad de adherencia, en un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, los neutrófilos de centenarios presentaron unos valores de adherencia menores que los sujetos de 65-75 años y parecidos a los de personas adultas de 25-35 años de edad ([Alonso-Fernández et al. 2008](#)) aunque estudios previos han describieron que los neutrófilos y linfocitos de personas centenarias presentan niveles elevados de ciertas moléculas de adhesión en su superficie ([Cossarizza et al. 1997](#); [Ginaldi et al. 1999a](#); [Moroni et al. 2005](#); [Franceschi et al. 1995](#)). Por otro lado, los estudios sobre la capacidad de las células inmunitarias para responder a un estímulo quimiotáctico, promoviendo así su movilidad dirigida o quimiotaxis, también indican que los neutrófilos y células mononucleares de centenarios tienen valores de esta actividad adecuados ([Franceschi et al. 1995](#); [1996](#); [Franceschi y Bonafè, 2003](#); [Alonso-Fernández et al. 2008](#)). En cuanto a otras funciones de la inmunidad innata en personas que alcanzan una gran longevidad, concretamente en la función fagocítica, se ha descrito que los neutrófilos de centenarios presentan un mayor índice fagocítico que las personas de 42-64 y 65-75 años de edad ([Miyaji et al. 2000](#); [Alonso-Fernández et al. 2008](#)). Por otra parte, se ha demostrado que las células NK de los centenarios son capaces de eliminar células diana tan eficazmente como las de los jóvenes, gracias a la preservación de su actividad citotóxica ([Cossarizza et al. 1997](#)). Además, los linfocitos T periféricos procedentes de centenarios no sólo alcanzan sin dificultad la zona de inflamación, sino que también muestran una capacidad proliferativa preservada tras un estímulo apropiado ([Franceschi et al. 1995](#); [1996](#)). Del mismo modo, se ha demostrado que los descendientes de

centenarios presentan en la vejez un mejor funcionamiento del sistema inmunitario ([Rubino et al. 2019](#)).

Todos estos hallazgos sugieren que las personas que han sobrevivido hasta alcanzar una elevada edad poseen unos mecanismos inmunitarios preservados y eficaces, capaces de prevenir patologías y alargar la vida. Sin embargo, a pesar de que en las últimas décadas se ha observado un aumento en el número de personas que rondan los 100 años de edad, se podría considerar que son pocos los afortunados en alcanzar esa gran longevidad, desde el punto de vista demográfico ([Franceschi y Bonafe, 2003](#)). Esto nos lleva a plantear la pregunta de por qué unos alcanzan una elevada longevidad y otros no. Son muchos los inmunogerontólogos que opinan que el éxito reside en la combinación óptima entre un estilo de vida apropiado y el “background” genético de cada persona ([Cossarizza et al. 1997](#)). De hecho, se ha descrito que los centenarios poseen una serie de marcadores genéticos asociados a un mejor control de la inflamación ([Vasto et al. 2009](#)). Así, la posesión de ciertos genotipos asociados a una alta producción de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10, y una baja de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-6, aumentaría la posibilidad de alcanzar el límite extremo de la esperanza de vida.

A pesar de lo indicado, y lejos de lo que cabría esperar, los centenarios poseen grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y marcadores inflamatorios ([Franceschi et al. 1995](#); [Franceschi et al. 2000a](#); [Franceschi y Bonafe, 2003](#); [Gerli et al. 2000](#)), y, por lo tanto, estos individuos de una longevidad excepcional también estarían afectados por el “*inflammaging*”. Así, en estudios que abarcan un amplio rango de edades, desde la década de los 20 hasta la centena, se ha observado un aumento exponencial de IL-6 en plasma con la edad, donde los centenarios presentarían los niveles más elevados de esta citoquina ([Bruunsgaard et al. 1999](#); [Giuliani et al. 2001](#); [Forsey et al. 2003](#); [Ferrucci et al. 2005](#); [Moroni et al. 2005](#)). En estos sujetos también se encuentran elevados los niveles de TNF- α y PCR ([Bruunsgaard et al. 1999](#); [Sandmand et al. 2003](#); [Ferrucci et al. 2005](#)). Además, en los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares tras haber sido estimuladas, también se observan unos niveles muy elevados de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en personas centenarias ([Cossarizza et al. 1997](#)). Cabe destacar que, en cultivos de granulocitos purificados, donde la mayoría de las células son neutrófilos, las células procedentes de centenarios sanos (que no toman medicinas ni requieren cuidados especiales), son las que más IL-1 β y TNF- α producen tras un estímulo, mientras que el grupo de individuos de 42-64 años y los centenarios no sanos, que se caracterizan por ser dependientes y necesitar cuidados diarios, producen niveles parecidos de estas citoquinas ([Miyaji et al. 2000](#)). Estos hechos han llevado a plantear la posibilidad del papel beneficioso de las citoquinas pro-inflamatorias en edades muy avanzadas. Otra posibilidad es que los efectos nocivos de los

elevados mediadores pro-inflamatorios que los centenarios presentan, sean contrarrestados por elevados niveles de citoquinas y mediadores anti-inflamatorios. De hecho, los centenarios presentan también un excelente sistema anti-inflamatorio de defensa, que compensaría los efectos adversos del “*inflammaging*” y que constituirían la base de su escape al daño y su alta longevidad (Gerli et al. 2000; Forsey et al. 2003; Franceschi et al. 2007a; 2007b; Giunta et al. 2008; Minciullo et al. 2016; Storci et al. 2019).

Como ya se ha comentado anteriormente, son muchas las evidencias que apuntan al estrés oxidativo como el principal responsable del deterioro del sistema inmunitario y del organismo en general, definido por un aumento de compuestos pro-oxidantes y disminución de defensas antioxidantes (Daynes et al. 2003; De la Fuente y Miquel, 2009; Salminen y Kaarniranta, 2010). Sin embargo, los centenarios se caracterizan por presentar un bajo grado de estrés oxidativo, lo que concuerda con el adecuado mantenimiento de la funcionalidad inmunitaria. Son varios los trabajos que indican que los centenarios, respecto a individuos de edad avanzada, tienen un menor daño oxidativo a lípidos, como por ejemplo cantidades bajas de malondialdehído (MDA), y que a su vez presentan mayores defensas antioxidantes, como sucede con el glutatión total, la relación GSH/GSSG, las vitaminas A, C y E plasmáticas y la actividad de la catalasa. La presencia de esos niveles más bajos de oxidantes y más elevados de antioxidantes en los centenarios (Paolisso et al. 1998; Mecocci et al. 2000; Barbieri et al. 2003; Alonso-Fernández et al. 2008), les conferiría de una mayor resistencia al estrés oxidativo (Sizzano et al. 2018). Sin embargo, se desconoce si estos individuos han sido capaces de mantener un funcionamiento del sistema inmunitario óptimo, y unos niveles de estrés oxidativos controlados a lo largo de toda su vida, o si en cambio, experimentan las desregulaciones asociadas a la edad tanto en las funciones inmunitarias como en los parámetros redox, pero son capaces de compensarlas, debido a una buena capacidad de adaptación. De hecho, recientemente se ha propuesto como responsable del proceso de envejecimiento al deterioro de la “homeostasis adaptativa”, la cual se vería afectada, sobre todo, a partir del último tercio de la vida (Pomatto y Davies, 2017; Pomatto, 2019). Así, podría ser que los centenarios mantienen esta homeostasis adaptativa, siendo capaces de adaptarse a los cambios asociados al envejecimiento, especialmente en una edad avanzada (Pomatto, 2019). De hecho, se ha propuesto que los mejores candidatos para convertirse en longevos no son los sujetos más fuertes y robustos de su cohorte de edad, sino los sujetos que mejor se adaptan al entorno, mostrando una mayor plasticidad biológica (Ventura et al. 2007).

Por tanto, se hace necesario un abordaje longitudinal en ratones (ya que en humanos sería inabordable, dada su elevada longevidad), monitorizando los animales desde su edad adulta,

hasta la muerte de cada individuo para investigar qué cambios o adaptaciones (en el caso de que los haya) en el funcionamiento del sistema inmunitario y en parámetros oxidativos e inflamatorios experimentan los animales que logran alcanzar una elevada longevidad.

Además, aunque algunos parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio han sido propuestos como marcadores de salud y longevidad, aún se desconoce si alguno de estos parámetros podría ser predictivo de supervivencia o mortalidad en centenarios.

1.10. LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNOENDOCRINA

Además de lo comentado hasta ahora sobre la importancia de un adecuado funcionamiento del sistema inmunitario en el mantenimiento de la salud, hay que tener en cuenta que este sistema no trabaja de forma aislada, sino que lo hace en conexión con los otros sistemas homeostáticos del organismo como son el sistema nervioso y el endocrino, constituyendo un sistema neuro-inmuno-endocrino. Actualmente son ya muchos los trabajos que confirman la existencia de una comunicación bidireccional entre los sistemas homeostáticos, la cual se lleva a cabo a través de neurotransmisores, hormonas y citoquinas, que coexisten en los tejidos nerviosos, endocrinos y linfoides y cuyos receptores se encuentran presentes en las células de los tres sistemas ([Godoy et al. 2018](#)). Por lo tanto, cualquier influencia sobre el sistema inmunitario, ejercerá un efecto sobre los sistemas nervioso y endocrino, y viceversa ([Besedovsky y Del Rey, 1996](#), [Del Rey y Besedovsky, 2018](#)). Este sistema neuroinmunoendocrino es el responsable de la preservación de la homeostasis del organismo y, consecuentemente, de la salud ([Besedovsky y Del Rey, 2007](#)).

Mientras que el sistema neuroendocrino es un receptor de estímulos cognitivos, como la luz, el sonido, las situaciones de estrés, etc., a los cuales responde liberando mediadores, neurotransmisores y hormonas, que alcanzan el sistema inmunitario para informar sobre la situación, el sistema inmunitario representa un sistema de recepción de estímulos no-cognitivos que aparecen en el organismo ([Dozmorov et al. 2010](#)). El sistema inmunitario responde a estos estímulos, infecciones, células tumorales u otros tipos de células extrañas y transfiere la información, por medio de las citoquinas que produce, al sistema neuroendocrino ([Blalock, 1984](#), [Dozmorov et al. 2010](#), [Del Rey y Besedovsky, 2018](#)). En este contexto, se ha descrito que, al envejecer, no sólo se deteriora el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, sino también la comunicación entre dichos sistemas: la comunicación neuroinmunoendocrina. Tal es la importancia de la alteración que sufre esta comunicación, que ha sido propuesta como causante

de los cambios que tienen lugar en el envejecimiento y del aumento de morbilidad y mortalidad que aparece al avanzar la edad (Fabris, 1991; De la Fuente y Miquel, 2009; De La Fuente, 2018a).

Además, la confirmación científica de esta comunicación ha permitido comprender por qué las situaciones de depresión, el estrés emocional o la ansiedad, pueden provocar una mayor susceptibilidad a infecciones, cánceres o enfermedades autoinmunes (Arranz et al. 2007; Arranz et al. 2009a; 2009b; Costa-Pinto y Palermo-Neto, 2010; Cruces et al. 2014). Esta mayor susceptibilidad supone la existencia de una alteración del sistema inmunitario, lo que resultaría en una peor salud y una menor longevidad. Por el contrario, situaciones agradables o una visión optimista de la vida, ayudarían al mantenimiento de una buena función inmunológica (Barak, 2006). También se ha comprobado que los cambios en el sistema inmunitario, como los que tiene lugar en un proceso infeccioso, alteran las funciones del sistema nervioso dando lugar al “comportamiento de enfermedad” (del inglés, “*sickness behaviour*”), que engloba a los trastornos conductuales que acompañan la infección e inflamación y que incluyen letargia, somnolencia, depresión, falta de apetito y sed, así como la disminución de la interacción social (Dantzer, 2001).

Es difícil determinar, en el contexto de las alteraciones que tienen lugar en la comunicación neuroinmunoendocrina al envejecer, si son los cambios en el sistema nervioso los que inducen modificaciones en el sistema inmunitario o si son las alteraciones inmunitarias las responsables de los cambios neurológicos, o si bien ambos procesos tienen lugar simultáneamente, lo que parece ser lo más probable según algunos autores (Bellinger et al. 2001).

1.11. ENVEJECIMIENTO ACELERADO: INADECUADA RESPUESTA AL ESTRÉS

En la actualidad, todo lo que rodea al individuo, como el trabajo, la economía, el medio natural o las circunstancias personales, genera grandes dosis de tensión, produciendo en él un estado de inquietud y malestar, que en muchos casos desencadena graves dolencias físicas. Este hecho ha generado que el término estrés se haya convertido en un vocablo habitual de nuestra sociedad y que la importancia del estudio del estrés, desde su descubrimiento en los años treinta del siglo pasado, haya aumentado considerablemente, llegando a proponerse como un problema de primer orden en las sociedades desarrolladas (Godoy et al. 2018)

El estrés, o más correctamente la respuesta a los estímulos estresantes, puede definirse como las modificaciones fisiológicas que manifiesta un individuo en respuesta a los cambios internos

y externos (ambientales o psicosociales). En este contexto, los ejes Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y Simpático-Adreno-Medular (SAM) suponen las vías principales involucradas en la respuesta al estrés, mediante la liberación de glucocorticoides (GC) y catecolaminas (CA), respectivamente. No obstante, ante una situación estresante, también se activan otras vías neuroendocrinas tales como el sistema renina-angiotensina y otras vías hipotalámicas, que desencadenan la liberación no sólo de glucocorticoides (GC) y catecolaminas (CA), ya mencionados, sino también de otros moduladores como los opiáceos, la dehidroepiandrosterona (DHEA), la hormona del crecimiento (GH) o la prolactina. Sin embargo, el grado de activación de estos componentes neuroendocrinos dependerá de diversos factores, siendo el tiempo de duración del estímulo estresante uno de los más importantes. Así, se propone que el eje SAM se activa de forma predominante cuando el individuo que se enfrenta a la situación estresante es capaz de mantener el control de dicha situación, mientras que el eje HHA parece activarse de forma dominante en situaciones de estrés que provocan en el sujeto una pérdida de control o incluso una sensación de impotencia ([Henry y Wang, 1998](#)). Por lo tanto, se puede decir que un estrés de tipo agudo activará de forma primordial al eje SAM y, por el contrario, el eje HHA se activará, mayoritariamente, durante un estrés crónico.

Las células inmunitarias presentan receptores adrenérgicos de tipo $\beta 2$ ([Madden, 2003](#)), que pueden unir mediadores del eje SAM, como la Adrenalina y la Noradrenalina, así como receptores para los glucocorticoides ([Marchetti et al. 2001](#)). Por tanto, a través de estos receptores, tanto las CA como los GC van a modular una gran variedad de funciones del sistema inmunitario como el tráfico leucocitario, la proliferación, la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos y la actividad citotóxica ([Madden et al. 1995](#); [Besedovsky y Del Rey, 2011](#)). Además, si bien las CA y los GC son las hormonas del estrés con capacidad para actuar sobre las células inmunitarias que han sido más estudiadas, otros factores que también son liberados durante esta respuesta, incluyendo la prolactina, la GH, la melatonina, DHEA, β -endorfina y encefalina, también inducen cambios en la respuesta inmunitaria ([Csaba, 2014](#)).

A pesar de que la interacción entre el estrés y la inmunidad ha sido ampliamente estudiada, las ideas sobre dicha relación han cambiado a lo largo del tiempo. Tradicionalmente, se postulaba que el estrés ejercía un efecto inmunosupresor, dado que se había observado que individuos estresados mostraban una atrofia de algunos de sus tejidos linfoides ([Selye, 1937](#)). También se asumía que el estrés crónico inducía una disminución de la actividad NK y de la capacidad de proliferación de los linfocitos junto con una respuesta de anticuerpos deficiente ([Herbert y Cohen, 1993](#); [Kiecolt-Glaser et al. 1996](#); [Cohen et al. 2001](#)). Este concepto aceptado durante mucho tiempo de que el estrés induce un efecto netamente inmunosupresor está siendo

reconsiderado. En este contexto, se ha propuesto que los efectos del estrés sobre el sistema inmunitario serían duales, de manera que la respuesta inmunitaria podría verse potenciada por el estrés agudo y suprimida por el estrés crónico. Por tanto, las CA actuarían activando la inmunidad y los GC la suprimirían (Cruces et al. 2014). De forma general, un estrés agudo inducirá en el sistema inmunitario cambios adaptativos con el objetivo de proteger al organismo de una posible lesión o infección durante la respuesta de “lucha o huida”, potenciando la respuesta inmunitaria innata ya que su activación es rápida y requiere poco gasto energético. Por el contrario, reprimirá la activación de la inmunidad adquirida, y particularmente de la capacidad proliferativa de los linfocitos, ya que ésta requiere más tiempo y energía. Conforme la exposición al estrés se prolonga, convirtiéndose en crónica, se reduce la capacidad de adaptación a los cambios que éste induce, de manera que el estrés crónico conllevaría una inmunosupresión de ambas ramas de la inmunidad, tanto de la innata como de la adquirida (Segerstrom y Miller, 2004). En la **Figura 7**, situada en el Anexo I, se incluye un esquema resumen de la respuesta neuroinmunoendocrina ante un estrés agudo y un estrés crónico.

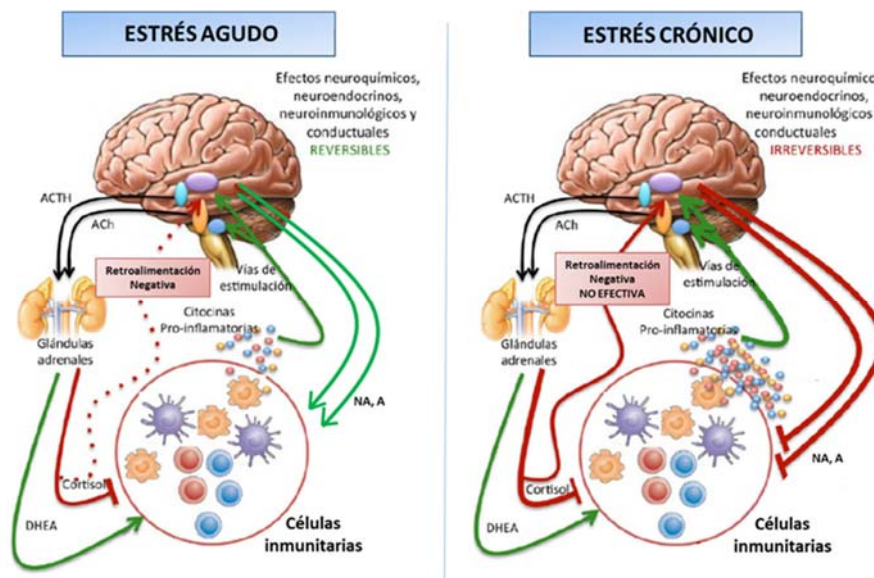


Figura 7. Esquema resumen de la respuesta neuroinmunoendocrina ante un estrés agudo y un estrés crónico. ACh, acetilcolina; ACTH, hormona adrenocorticotropa; NA, noradrenalina; NPY, neuropéptido Y; DHEA, dehidroepiandrosterona; A, adrenalina; BEP, β -endorfinas. (Fuente: modificado de Murillo-Rodríguez E, Machado S, Barbosa R Rocha N, Barciela Veras A. *Temas Selectos en Neurobiología Molecular e Integrativa* October 2017. Publisher: Universidad del Mayab S.C. ISBN: 978-607-8083-25-1). Ante un estrés de tipo agudo, se activará, en primer lugar, el eje SAM, el cual mediante la liberación de A y NA, potenciará las funciones inmunitarias innatas de forma transitoria; tras lo cual, el cortisol, el cual, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa, terminará la respuesta. Por el contrario, ante un estrés de tipo crónico, se activa principalmente el eje HHA, y mediante la liberación de cortisol, se suprimirá tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Además, en este caso, el mecanismo de retroalimentación negativa no es eficiente, por lo que la supresión inmunitaria perdura en el tiempo, teniendo graves consecuencias en la salud del individuo.

De este modo, una adecuada respuesta al estrés es esencial para el mantenimiento de la salud, mientras que una inadecuada respuesta al estrés va a causar un mal funcionamiento inmunitario y, por tanto, de los otros sistemas fisiológicos, lo que va a suponer un envejecimiento acelerado (McEwen, 2002; Blalock, 2005; Bauer, 2008; Cruces et al. 2014, De La Fuente, 2018a). De hecho, el estrés se considera hoy como un claro factor de riesgo que acelera el proceso de envejecimiento, la inmunosenescencia y la aparición de múltiples enfermedades asociadas a la vejez (Espinosa-Oliva et al. 2011; Machado et al. 2014, De La Fuente, 2018a). Si bien el estrés, en cualquier edad, constituye un factor de riesgo para la salud, el bienestar y la calidad de vida de las personas; éste se torna particularmente nocivo en la tercera edad, debido al deterioro que tiene lugar en los sistemas reguladores, así como en la comunicación neuroinmunoendocrina al envejecer, y que en última instancia provoca una menor capacidad de respuesta a estímulos estresores.

La mayoría de los estudios que han investigado la respuesta al estrés se han llevado a cabo en ratones, ya que en éstos es muy fácil evaluar dicha respuesta mediante el sometimiento de los mismos a distintas pruebas conductuales. Así, algunos autores han demostrado que la esperanza de vida en ratones se encuentra inversamente relacionada con la intensidad de sus respuestas conductuales y neuroendocrinas al ser expuestos a estímulos estresantes como lo es el realizar una prueba de exploración (Dellu et al. 1994). Tal es la relación entre la respuesta al estrés y la longevidad, que nuestro grupo de investigación ha propuesto un modelo de envejecimiento prematuro natural en ratón basado en las diferencias conductuales manifestadas por los animales al enfrentarse a un ambiente novedoso y, por tanto, estresante: la prueba de exploración conocida como el “laberinto en T” (Guayervas et al. 2002a; 2002b; 2002c; Viveros et al. 2001; Viveros et al. 2007). En esta prueba y situando al ratón en la base de la T, se cronometra el tiempo que tarda el animal en llegar a la intersección de la T. Dicha prueba conductual se realiza una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas. Así, cuando los ratones son sometidos a esta prueba conductual, se observó que algunos de ellos manifestaban conductas de inmovilización o congelación, características de una inadecuada respuesta al estrés, tardando más tiempo en realizar dicha prueba en las cuatro sesiones comportamentales. Estudios posteriores demostraron que estos animales, inicialmente llamados “slow”, presentaban patrones conductuales y parámetros neurológicos, endocrinos e inmunitarios similares a los observados en ratones cronológicamente viejos, así como una menor esperanza de vida que aquellos otros ratones del mismo lote, cepa, sexo y edad que mostraban una adecuada respuesta al estrés al ser sometidos a la prueba del “laberinto T”, realizándola en menor tiempo en las cuatro sesiones (Guayervas et al. 2002a; 2002b; 2002c; Viveros et al. 2001;

Viveros et al. 2007; Vida et al. 2014). Por tanto, los primeros fueron denominados ratones prematuramente envejecidos o PAM (del inglés, "*Prematurely Aging Mice*"), mientras que los segundos se denominaron en principio NPAM (del inglés, "*Non-Prematurely Aging Mice*"). Posteriormente, a esos NPAM se les ha denominado: ratones excepcionales no prematuramente envejecidos o E-NPAM (del inglés, "*Exceptional Non-Prematurely Aging Mice*"), dado que realmente era un término más ajustado a sus características. Los ratones que mostraban conductas intermedias, completando la prueba conductual en distintos tiempos en cada sesión (representan el 60-70% de la población) y que no fueron considerados en los estudios llevados a cabo hasta el momento sobre este modelo de envejecimiento prematuro, se les denominó "intermedios" y posteriormente R-NPAM (del inglés, "*Regular Non-Prematurely Aging Mice*").

Con respecto a las alteraciones conductuales, se ha descrito que los PAM manifiestan un deterioro de las capacidades sensoriomotoras tales como el vigor neuromuscular y la coordinación motora, una menor actividad locomotora o exploratoria, así como una mayor emotividad y ansiedad en comparación con los NPAM de su misma edad cronológica (Viveros et al. 2001; Pérez-Álvarez et al. 2005; Hernández, 2016). Además de estas alteraciones comportamentales, los PAM también muestran alteraciones neuroendocrinas y neuroquímicas como mayor concentración basal de corticosterona o alteraciones en los niveles de monoaminas en distintas regiones cerebrales en comparación con los NPAM (Pérez-Álvarez et al. 2005).

Asimismo, los PAM también se caracterizan por mostrar una inmunosenescencia prematura. Así, los estudios inmunitarios realizados en los PAM han demostrado que los leucocitos de estos animales manifiestan, en general, una mayor capacidad de adherencia y una menor quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, menor capacidad fagocítica y microbicida de los macrófagos, una más baja respuesta proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos (Con A y LPS), así como una menor actividad citotóxica NK y de liberación de IL1- β e IL2 con respecto a los NPAM (Guayerbas et al. 2002a; 2002b; 2002c; Puerto et al. 2002; Guayerbas et al. 2005; Alvarado et al. 2006a; Viveros et al. 2007; De la Fuente y Giménez-Llort, 2010). Además de una inmunosenescencia prematura, los PAM muestran mayores cantidades de compuestos inflamatorios, como el TNF α , y la prostaglandina E2 (PGE2) que los NPAM (Alvarado et al. 2006a; 2006b). También en los PAM, se observaron mayores cantidades de oxidantes en los leucocitos (anión superóxido, óxido nítrico, GSSG, el cociente GSSG/GSH, MDA y la actividad de la enzima XO) junto con menores de las defensas anti-oxidantes (GSH o las actividades de las enzimas SOD, CAT, GPx y GR), en comparación con los NPAM (Alvarado et al. 2006a; 2006b; Vida et al. 2014).

Por lo tanto, en estos ratones prematuramente envejecidos ya en edades tempranas se establece un estrés oxidativo e inflamatorio en sus leucocitos, y otros tejidos, característico de ratones viejos, que subyacerían al deterioro funcional de sus sistemas reguladores. Todos estos hallazgos indicarían que los PAM muestran un envejecimiento prematuro, lo que explicaría la esperanza de vida más corta de los PAM en comparación con los NPAM de igual edad cronológica (Viveros et al. 2007; De la Fuente y Miquel, 2009).

Del mismo modo, se ha demostrado en humanos que el estar sometido a situaciones de estrés de forma crónica repercute en la funcionalidad del sistema inmunitario, así como en el estado de oxidación e inflamación. En cambio, un aspecto que ha sido menos tenido en cuenta es cómo los individuos responden a dicho estrés o lo que es lo mismo, la percepción subjetiva de dicho estrés. Es importante destacar que los mecanismos cognitivos que median la percepción del estrés, el afrontamiento y la sensación de control y los factores psicosociales, como el apoyo social, son determinantes críticos de la duración y la magnitud de una respuesta de estrés fisiológica impulsada por el cerebro para un determinado factor estresante (Afshar et al. 2015). La percepción cognitiva, así como la forma de afrontar el estrés son especialmente importantes en los seres humanos porque pueden "convertir" psicológicamente los factores estresantes agudos en respuestas de estrés fisiológico crónico. El estrés psicógeno también es un fenómeno muy importante en los seres humanos porque puede generar respuestas de estrés fisiológico mucho después de la exposición al factor estresante (por ejemplo, enojo persistente / alteración del estado de ánimo después de un altercado social) o incluso en ausencia de un factor estresante físico o una amenaza saliente (Dhabhar, 2009). Para ello se desarrolló la Escala de estrés percibido (del inglés, "*Perceived Stress Scale*", PSS) (Cohen et al. 1983), la cual constituye uno de los autoinformes más utilizados en la actualidad para estimar el grado en que las personas sienten que controlan las circunstancias de la vida o se ven desbordadas por ellas. El cuestionario evalúa el nivel de estrés percibido durante el último mes, consta de 10 ítems con un formato de respuesta de una escala de cinco puntos (0 = nunca, 1 = casi nunca, 2 = de vez en cuando, 3 = a menudo, 4 = muy a menudo). Los elementos evaluados son de carácter general en lugar de centrarse en eventos o experiencias específicas (Revisado en Lee et al. 2012) y a mayor puntuación obtenida, mayor grado de estrés percibido. Es importante destacar el hecho de que el grado de estrés percibido es influenciado por estresores diarios, eventos vitales, y por los medios y recursos de los cuales la persona disponga en un determinado momento (Remor, 2006), por lo que supone una medida de la capacidad de respuesta al estrés. De acuerdo con esto, Pedrero-Pérez y colaboradores (2015) demostraron que un elevado grado de estrés

percibido estaba relacionado con conductas de evitación, las cuales, en definitiva, manifestarían una inadecuada respuesta al estrés.

Por todo lo indicado, se hace necesario investigar si distintos grados de estrés percibido, independientemente del tipo de estrés, pueden causar alteraciones en el funcionamiento del eje neuro-inmuno-endocrino, así como en el estado oxidativo e inflamatorio y en la velocidad de envejecimiento del individuo.

1.12. ENVEJECIMIENTO PATOLÓGICO: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Como se ha comentado anteriormente, el aumento en la esperanza de vida y el progresivo envejecimiento de la población ha traído consigo un importante aumento de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Este sería el caso de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), cuya prevalencia aumenta con la edad, siendo la causa de demencia más común en personas de edad avanzada (OMS, 2019). Estimaciones recientes indican que la prevalencia global de la enfermedad es de unos 35,6 millones de personas en el mundo y las predicciones apuntan a que en el año 2030 existirán más de 115 millones de pacientes con EA (OMS, 2019). Además, esta enfermedad afecta a entre el 5-10% a población mayor de 65 años y hasta a un 45% de los mayores de 85 años (OMS, 2019). Dada su alta prevalencia mundial y al alto impacto socioeconómico que tiene el aumento de su incidencia, supone uno de los retos sociales y sanitarios más importantes de cara a las próximas décadas, sobre todo en países que tienen una elevada esperanza de vida media. Por ello, en la actualidad son cada vez más numerosas las investigaciones básicas y clínicas cuyos retos están dirigidos a dilucidar las causas etiopatológicas que subyacen a esta enfermedad, al descubrimiento de métodos para diagnosticar a los pacientes en fases más tempranas de la misma, así como a encontrar nuevos tratamientos para prevenir o curar la enfermedad.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible, que está asociado al proceso de envejecimiento, y que se caracteriza clínicamente por una pérdida progresiva de la memoria, deterioro cognitivo e intelectual, así como por trastornos de la personalidad y del comportamiento (Corey-Bloom, 2002). En las primeras fases de la enfermedad el impacto psicológico en el paciente es devastador y en estadios avanzados, éste evoluciona a un mutismo casi absoluto con un deterioro progresivo de sus capacidades motrices pudiendo llegar a una total desconexión con el entorno, siendo incapaz de controlar sus funciones fisiológicas más simples (Corey-Bloom, 2002). Así, en general, la EA da lugar a una

pérdida gradual de las funciones fisiológicas del organismo, que finalmente conducen a la muerte del individuo ([Giménez-Llort et al. 2012](#)). Aunque actualmente existe un gran avance en el conocimiento de la EA y en el entendimiento de algunos procesos biológicos que subyacen a esta enfermedad, su etiología todavía es desconocida. En general se ha descrito que la EA tiene un origen multifactorial, en el que intervienen factores genéticos y ambientales ([Hsiung et al. 2004](#); [Iqbal y Grundke-Iqbal, 2010](#)). En cuanto a los factores genéticos se han descrito alteraciones en tres genes que se han asociado a formas preseniles autosómicas dominantes de la enfermedad, como el gen que codifica para la proteína precursora del péptido beta-amiloide (APP) y los genes de las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2) ([Rademakers et al. 2003](#)). Las mutaciones en estos genes se han encontrado principalmente en la forma hereditaria de la EA, también conocida como EA familiar. Además, un cuarto gen, el gen de la apolipoproteína E (ApoE), se ha asociado tanto con la forma esporádica (supone más del 95% de los casos de EA) como de la forma hereditaria ([Corder et al. 1993](#); [Hsiung et al. 2004](#)).

Neuropatológicamente, la EA se caracteriza por la presencia de graves alteraciones neurológicas, tanto a nivel anatómico como fisiológico ([Corey-Bloom, 2002](#)). Aunque son muchas las alteraciones que se observan en el cerebro de los enfermos de Alzheimer existen dos alteraciones histológicas estructurales características, como son: el desarrollo de placas amiloides en el espacio extracelular, compuestas principalmente por el péptido beta-amiloide (β A), así como el desarrollo y depósito intracelular de ovillos neurofibrilares o agregados hiperfosforilados de la proteína tau en las neuronas, además de otras alteraciones moleculares y neuroquímicas ([Huang y Jiang, 2009](#); [Bloom, 2014](#)). Estas alteraciones son más aparentes en la neocorteza, las estructuras límbicas, como el hipocampo y la amígdala, así como en núcleos del tronco del encéfalo.

El principal problema que presenta esta enfermedad es que la misma se diagnostica en fases muy avanzadas de la misma, cuando el cerebro ya está irreversiblemente dañado. Sin embargo, numerosos estudios longitudinales han demostrado que la demencia asociada a la EA es precedida por una larga fase asintomática (preclínica) seguida de una fase de transición (prodrómica) caracterizada por la presencia de un deterioro cognitivo leve (DCL) ([Amieva et al. 2008](#); [Price et al. 2009](#); [Sperling et al. 2011](#)). Por tanto, esta fase intermedia ofrece numerosas posibilidades en cuanto a intervenciones terapéuticas. Actualmente, la fase de deterioro cognitivo leve se diagnostica en base a los siguientes criterios: quejas subjetivas por parte del paciente, así como el requisito de que ningún otro dominio (salvo el de la memoria) debe verse afectado en estos pacientes ([Petersen et al. 1999](#); [Portet et al. 2006](#)). La dificultad radica en encontrar marcadores que permitan clasificar a los pacientes en una fase u otra, así como

encontrar marcadores específicos que puedan ser utilizados como marcadores prodrómicos de la enfermedad.

En la última década numerosas investigaciones, tanto en humanos como en modelos animales para la EA, han demostrado la implicación del estrés oxidativo, así como el daño asociado a éste, en la patogénesis y la posible etiología de la enfermedad (Coyle y Puttfarcken, 1993; Butterfield, 1997; Christen, 2000; Butterfield et al. 2001; Nunomura et al. 2001; Xiang et al. 2006; Zhu et al. 2007; Recuero et al. 2009; Persson et al. 2014; Barbagallo et al. 2015; Huang et al. 2016; Butterfield and Halliwell, 2019). La falta de protección frente a la excesiva producción de ROS y RNS en el envejecimiento del cerebro, debida a los déficits en los sistemas de defensa antioxidantes, podría ser una de las causas desencadenantes de la EA, así como una fuerza impulsora en la progresión de la misma (Persson et al. 2014). Tal es el papel que el estrés oxidativo juega en el desarrollo y progresión de esta patología, que elevados niveles de daño oxidativo se han detectado en cerebro de pacientes con EA. Cada vez son más los estudios que ponen de manifiesto que estas alteraciones no sólo están limitadas al cerebro, sino que también pueden ser detectadas a nivel periférico. En este sentido se han encontrado niveles séricos elevados de MDA, isoprostanos y proteínas carboniladas en individuos con EA en relación a controles sanos (Sinem et al. 2010). También se han observado unos mayores niveles de daño oxidativo en el ADN de linfocitos y neutrófilos (Kadioglu et al. 2004; Migliore et al. 2005). En cuanto a los sistemas endógenos de defensa antioxidante, los distintos estudios en humanos y en modelos murinos para la EA muestran resultados contradictorios (aumento, disminución o no alteración), en función de la edad, de la localización y del parámetro estudiado (Persson et al. 2014). Así, en sujetos con Alzheimer se ha descrito una marcada disminución de la actividad de enzimas antioxidantes como la CAT, la GPx y la SOD, así como de las cantidades de compuestos antioxidantes como las vitaminas C y E en el plasma y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) (Jiménez-Jiménez et al. 1997; Rinaldi et al. 2003; Sultana et al. 2008; Mangialasche et al. 2010; Padurariu et al. 2010; Torres et al. 2011; Puertas et al. 2012; Vergallo et al. 2018; Colin et al. 2018). Además, también se ha visto que esa disminución de la actividad de SOD y CAT, así como de las concentraciones plasmáticas de compuestos antioxidantes, estaba correlacionada con un aumento de los niveles de peroxidación lipídica en los sujetos con EA y se asociaba a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Brigelius-Flohé y Traber, 1999; Rinaldi et al. 2003; Padarariu et al. 2010).

En base a todo esto, se hace necesario profundizar en el estudio de marcadores de estrés oxidativo a nivel periférico en individuos con deterioro cognitivo leve que puedan ser usados para un diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha argumentado a lo largo de la Introducción, la edad biológica es un mejor indicador que la edad cronológica de la velocidad a la que cada individuo está haciendo su envejecimiento, pero se tiene el problema de la dificultad de su determinación. El funcionamiento del sistema inmunitario ha sido propuesto como un excelente marcador de salud y una serie de parámetros indicativos de su funcionamiento han sido relacionados tanto con una mortalidad temprana como con una elevada longevidad. Dado que la adecuada función de las células inmunitarias depende del mantenimiento de un apropiado balance redox, nos propusimos investigar si una serie de parámetros de función y de estrés oxidativo de las células inmunitarias podrían servir como marcadores de la velocidad de envejecimiento, o lo que es lo mismo, podrían ser utilizados para determinar la edad biológica.

Para que un parámetro pueda ser validado como marcador de la velocidad de envejecimiento, debe cumplir, además de experimentar cambios con la edad, dos requisitos: el primero es que en aquellos individuos que tengan un envejecimiento exitoso, como lo son los que alcanzan una elevada longevidad, dicho marcador aparezca con valores de adulto, y el segundo, que valores altos o bajos de dicho marcador en relación con los propios de adultos sanos, se relacionen con una menor esperanza de vida. Mientras que el primer requisito puede ser validado tanto en humanos (utilizando los centenarios) como en animales de experimentación que de forma natural alcanzan una elevada longevidad, el segundo requisito sólo puede ser confirmado en animales de experimentación, ya que resulta una tarea muy difícil el monitorizar a humanos a lo largo de todo el proceso de envejecimiento, dada su elevada esperanza de vida. Así, la validación requiere la utilización de ratones que presenten un envejecimiento prematuro. En este sentido, en base a la comunicación entre los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino, nuestro grupo de investigación ha podido comprobar, en estudios previos, que los ratones que muestran una inadecuada respuesta al estrés tienen una inmunosenescencia prematura, un envejecimiento prematuro de su sistema nervioso y endocrino y una menor esperanza de vida que los de igual sexo y edad cronológica que no manifiestan esa inadecuada respuesta al estrés. Por ello, fueron propuestos como un modelo natural de envejecimiento prematuro.

En base a lo indicado, el primer objetivo que se propuso fue:

1^{er} objetivo. Validación de una serie de parámetros de función y de estrés oxidativo en células inmunitarias como marcadores de edad biológica, mediante su estudio a distintas edades, en el proceso de envejecimiento, en ratones (longitudinal) y humanos (transversal), así como en un modelo de ratones adultos con envejecimiento prematuro

Este objetivo se desarrolló en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

- 1.1. ¿Algunos parámetros de función inmunitaria en leucocitos de sangre periférica en humanos y del peritoneo en ratones pueden ser usados como marcadores de edad biológica?
- 1.2. ¿Algunos parámetros de estrés oxidativo en células de sangre periférica en humanos y en leucocitos peritoneales de ratón pueden ser marcadores de la velocidad de envejecimiento?

Además del aumento asociado a la edad en compuestos oxidantes, se ha descrito que el proceso de envejecimiento se relaciona con la presencia de una inflamación crónica de bajo grado, lo que constituye la denominada “*inflammaging*”, debida en parte al aumento de citoquinas pro-inflamatorias, y que puede ser predictiva de mortalidad. No obstante, los individuos longevos, a pesar de mantener un adecuado estado de salud, presentan altas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, lo que dificulta comprender si las mismas pueden resultar beneficiosas o perjudiciales en estos individuos. En este sentido, en los longevos se ha observado que la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a un estímulo se encuentra deteriorada en comparación con los adultos, a diferencia del resto de funciones inmunitarias. Sin embargo, se ha sugerido que estos individuos podrían presentar tiempos de respuesta de proliferación a un estímulo menores como estrategia adaptativa, por lo que sería necesario investigar tanto la capacidad proliferativa como la liberación de citoquinas en situación basal y tras estimulación a distintos tiempos.

Siguiendo en el contexto de conocer mecanismos relacionados con la longevidad, se ha sugerido que los individuos longevos, podrían mantener preservados los mecanismos de respuesta al estrés celular, entre los que se encuentran los eficientes mecanismos antioxidantes y anti-inflamatorios, que contrarrestarían el aumento asociado al avance de la edad de la oxidación e inflamación. Así, la chaperona Hsp70 (del inglés, “*Heat-shock protein*” 70), considerada una proteína fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del individuo al contribuir a mantener la estructura conformacional correcta de las proteínas celulares y, por ende, su función, se ha demostrado implicada en procesos clave del envejecimiento como la inhibición de la apoptosis y de la activación del factor de transcripción NF- κ B. En este sentido se ha comprobado que, si bien al envejecer se produce un deterioro en la inducción de esta chaperona ante distintos tipos de estrés, los individuos longevos mantienen esta capacidad preservada. No obstante, los cambios en cuanto a la concentración basal de esta chaperona en el

envejecimiento, han sido muy poco estudiados. Así, en la presente tesis nos planteamos como segundo objetivo:

2º objetivo. Identificación de mecanismos celulares y moleculares implicados en la velocidad de envejecimiento y longevidad, mediante su estudio en ratones de distintas edades incluyendo aquellos que de forma natural alcanzan una elevada longevidad y ratones con envejecimiento prematuro.

Este objetivo se ha desarrollado en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

2.1. ¿La proliferación de linfocitos y la liberación de mediadores pro- y anti-inflamatorios pueden ser usados como marcadores de envejecimiento saludable y longevidad?

2.2. ¿La concentración basal de la proteína de choque térmico, Hsp70, puede servir como marcador de envejecimiento y longevidad?

En la búsqueda de biomarcadores predictores de longevidad y mortalidad, se ha comprobado que el significado que en este sentido tenga un parámetro puede variar en función de la edad del individuo en el que se analice. Así, se ha demostrado que los valores de algunos parámetros, como la presión arterial sistólica, pueden indicar riesgo de mortalidad en la edad adulta, pero en edades avanzadas los mismos valores pueden ser predictivos de longevidad. En este sentido, se desconoce si algunos parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio pueden resultar ser predictores de mortalidad a cualquier edad o serlo únicamente a una determinada. Además, no existe en la actualidad ningún estudio que haya evaluado cuáles de estos parámetros, los de función inmunitaria, estrés oxidativo o estrés inflamatorio, resultan ser mejores predictores de esperanza de vida, al menos en ratones. Además de estos marcadores, estudios previos han relacionado una serie de parámetros conductuales en ratones, especialmente los que se asocian con comportamientos de ansiedad, con la mortalidad.

Por otra parte, el papel predictivo de mortalidad de la escala de fragilidad propuesta por Fried y colaboradores ha sido ampliamente documentado en humanos. Sin embargo, y a pesar de la reciente adaptación a ratones de los criterios de fragilidad evaluados en humanos, se desconoce si el índice de fragilidad de un ratón puede ser predictivo de su esperanza de vida, y si esta predicción depende de la edad del animal.

Por todo ello, el tercer objetivo de la presente tesis fue:

3^{er} objetivo. Estudio de la relación existente entre una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales y de fragilidad, y la esperanza de vida alcanzada por cada ratón.

Este objetivo se ha desarrollado en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

- 3.1. ¿El poder predictivo de longevidad de una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio es el mismo a distintas edades?
- 3.2. ¿Qué parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales resultan más potentes en la edad adulta para predecir la longevidad en el ratón?
- 3.3. ¿Los parámetros de fragilidad utilizados en humanos y aplicados a ratones pueden predecir la longevidad en estos animales?

Para que una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio puedan ser usados como marcadores de edad biológica, estos deberían estar alterados en situaciones de envejecimiento acelerado y patológico. En base a la comunicación entre los sistemas inmunitario, nervioso y endocrino, distintos estudios han descrito que el estar sometido a situaciones de estrés crónico provoca un aumento del estrés oxidativo, una mayor inmunosenescencia y un envejecimiento acelerado. Sin embargo, se desconoce cómo la percepción subjetiva del estrés, independientemente del tipo de estrés, puede afectar la respuesta inmunitaria, el estrés oxidativo e inflamatorio y, por ende, la velocidad de envejecimiento.

Por otra parte, estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA) presentan mayores niveles de estrés oxidativo en células de sangre periférica. No obstante, no se sabe si estos parámetros pueden estar alterados en posibles estadios tempranos de la enfermedad y si tendrían, por tanto, potencial para ser usados como marcadores prodrómicos de esta enfermedad.

Por otro lado, aunque se sabe que los centenarios presentan ciertas funciones inmunitarias con valores más propios de adultos y que ciertos parámetros del sistema inmunitario pueden ser

predictores de mortalidad en personas ancianas, se desconoce si algunos marcadores de función inmunitaria o estrés oxidativo e inflamatorio podrían ser usados para la predicción de supervivencia en centenarios.

Por todo lo indicado se planteó el siguiente objetivo:

4º objetivo. Validación de parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio como marcadores, en humanos, de envejecimiento acelerado, patológico y como predictores de supervivencia en centenarios tras un ingreso hospitalario e indicadores de su recuperación.

Este objetivo se ha desarrollado en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

- 4.1 ¿Los parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio se ven alterados en mujeres que presentan un alto grado de estrés percibido?
- 4.2 ¿Los parámetros de estrés oxidativo en células de sangre periférica pueden ser utilizados como marcadores prodrómicos de la enfermedad de Alzheimer?
- 4.3. ¿Qué parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio pueden ser predictivos de supervivencia tras un ingreso hospitalario en individuos centenarios, e indicadores de recuperación?

3. RESULTADOS

CAPÍTULO UNO: Validación de una serie de parámetros de función y de estrés oxidativo en células inmunitarias como marcadores de edad biológica, mediante su estudio a distintas edades, en el proceso de envejecimiento, en ratones (longitudinal) y humanos (transversal), así como en un modelo de ratones adultos con envejecimiento prematuro.

Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity

Irene Martínez de Toda^{1,2}, Ianire Maté^{1,2}, Carmen Vida^{1,2}, Julia Cruces^{1,2}, Mónica De la Fuente^{1,2}

¹Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

²Institute of Investigation, Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain

Correspondence to: Mónica De la Fuente; **email:** mondela@bio.ucm.es

Keywords: immune function, biological age, biomarker, aging, longevity

Received: August 10, 2016

Accepted: November 11, 2016

Published: November 28, 2016

ABSTRACT

Chronological age is not a good indicator of how each individual ages and thus how to maintain good health. Due to the long lifespan in humans and the consequent difficulty of carrying out longitudinal studies, finding valid biomarkers of the biological age has been a challenge both for research and clinical studies. The aim was to identify and validate several immune cell function parameters as markers of biological age. Adult, mature, elderly and long-lived human volunteers were used. The chemotaxis, phagocytosis, natural killer activity and lymphoproliferation in neutrophils and lymphocytes of peripheral blood were analyzed. The same functions were measured in peritoneal immune cells from mice, at the corresponding ages (adult, mature, old and long lived) in a longitudinal study. The results showed that the evolution of these functions was similar in humans and mice, with a decrease in old subjects. However, the long-lived individuals maintained values similar to those in adults. In addition, the values of these functions in adult prematurely aging mice were similar to those in chronologically old animals, and they died before their non-prematurely aging mice counterparts. Thus, the parameters studied are good markers of the rate of aging, allowing the determination of biological age.

INTRODUCTION

The chronological age, defined as the time elapsed since birth, fails to be an accurate indicator of the rate of the aging process [1], which starts at adult age and finishes at the end of the life of each subject. This is due to the heterogeneity that aging shows in the diverse members of a population. This phenomenon led to the concept of “biological age”, which estimates how well an individual functions in comparison with others of the same chronological age [2]. Given that biological age is a better indicator than chronological age of the health, remaining healthy life span and active life expectancy of each subject [2-4], its determination is very relevant. However, despite its simple definition, quantification of the biological age is a difficult task. Many studies have been carried out trying to obtain the most appropriate parameters for determining biological age and have been mainly focused on both physiological (respiratory function, systolic arterial tension, hematocrit...) as well as on biochemical (albumin, cholesterol, blood urea

nitrogen...) markers [5-10]. Moreover, other markers such as genetic (telomere length) [11] or epi-genetic (DNA methylation) [12] have also been proposed. Nevertheless, despite different sets of markers being proposed in these studies, none of them have been validated. Therefore, the subject is still incomplete and more research should be carried out.

Most work on biological age has not included parameters of the immune system, which is a homeostatic system that contributes to the appropriate function of the organism. It is well known that with aging there is an increased susceptibility to infectious diseases, autoimmune processes and cancer, which indicates the presence of a less competent immune system, exerting a great influence on age-related morbidity and mortality [13, 14]. Since it has been demonstrated that the functioning of the immune system is an excellent marker of health [15, 16] and given that several age-related changes in immune functions have been linked to longevity [17-19] whereas others have been shown to

be predictive of mortality [20-22], the aim of the present study was to determine if some immune functions could be useful as markers of biological age and therefore as predictors of longevity.

In order to validate a potential set of parameters as markers of biological age, it is necessary to confirm that the levels shown in particular subjects reveal their real health and senescent conditions and consequently, their rate of aging. This has to be demonstrated by meeting two requirements. The first is that if an adult individual shows values characteristic of a chronologically old individual, he/she should die prematurely. The second is that a long-lived individual, known to have experienced healthy aging, should have a value of these biomarkers similar to that of an adult [16]. The first requisite can only be confirmed in experimental animals, given that it is a difficult task to follow-up human subjects throughout the whole aging process due to their long life span. Thus, mice were chosen for our study, which show a mean longevity of about 2 years. Previous studies from our group have proposed a murine model of premature aging based on an inappropriate reactivity to stress. Thus, prematurely aging mice (PAM) are identified by their poor response in a simple T-maze test. These PAM at the adult age showed a premature immunosenescence that was accompanied by a shorter lifespan compared to their counterpart non prematurely aging mice (NPAM) of the same sex and chronological age [23, 24]. The second requirement can be confirmed in both humans (centenarians) and experimental animals such as extremely long-lived mice.

Among all the possible functions of immune cells, we have focused on the ones that are the most relevant in the immune response and are known to experience an age-related decrease [25]. In *phagocytes*, their ability to migrate towards the focus of infection (chemotaxis) and their capacity to ingest foreign particles (phagocytosis); in *natural killer (NK) cells*, their capacity to destroy tumor cells and in *lymphocytes*, their ability to migrate towards the site of antigen recognition (chemotaxis) and to proliferate in response to mitogens (lymphoproliferation).

Thus, in order to validate the above mentioned immune functions as markers of biological age and predictors of longevity, these functions were studied in leukocytes isolated from peripheral blood of human subjects in a cross-sectional study, from their 30s until their 100s. In addition, the same functions were analyzed in leukocytes obtained from peritoneum of mice without killing them, enabling a longitudinal study to be performed, starting at the adult age and following each animal until its death. The same functional parameters were also assessed in peritoneal leukocytes from adult PAM and NPAM.

RESULTS

In this study, in order to identify and validate several functions of immune cells as markers of biological age and predictors of longevity, their age-related changes were measured in leukocytes from both humans and mice.

The results obtained in the functions studied in isolated human blood neutrophils (chemotaxis and phagocytic capacities) and mononuclear cells, principally lymphocytes and NK cells (the anti-tumor cytotoxic activity of NK cells as well as the chemotaxis and proliferative response of lymphocytes to mitogens), obtained from adult, mature, old and long-lived subjects are shown in Fig. 1. Neutrophil chemotaxis (Fig. 1.A1) and phagocytosis (Fig. 1.B1), as well as the activity of NK cells (Fig. 1.C1), lymphocyte chemotaxis (Fig. 1.D1) and proliferative response (Fig. 1.E1) showed lower values ($P < 0.001$) in old individuals in comparison to those in adults. These lower values were also shown in mature subjects ($P < 0.001$ in neutrophil chemotaxis and phagocytosis; $P < 0.01$ in chemotaxis of lymphocytes and $P < 0.05$ in NK activity). In addition, to further explore the relationship between the age and the immune parameters analyzed, *Pearson's* correlations were carried out (Table 1). The results showed statistically significant negative correlations ($P < 0.001$) between the age of the subjects and the values of all the immune functions evaluated.

In peritoneal leukocytes from mice these immune functions, analyzed at the corresponding ages to humans, but in a longitudinal study, changed in a similar manner (Fig. 1A2, B2, C2, D2 and E2). Thus, the results showed a significant decrease ($P < 0.001$) in the values of all the functions studied at old age with respect to those when they were adults. This decrease was also appreciated at mature age ($P < 0.001$ in phagocytosis of macrophages and lymphoproliferation, $P < 0.01$ and $P < 0.05$ in chemotaxis of macrophages and lymphocytes, respectively). Therefore, the results revealed that these immune functions of murine peritoneal leukocytes present a similar age-related evolution to those in human blood immune cells.

Considering the state of these functions in subjects which reach a high longevity, and consequently have attained successful aging, both humans and mice showed in general, more similar values to those observed at adult age than to those at old age, primarily in mice (Fig. 1). Thus, human centenarians showed higher values in all the functions analyzed with respect to old subjects ($P < 0.05$ in neutrophil chemotaxis and lymphoproliferation; $P < 0.001$ in neutrophil phagocytosis, NK activity and lymphocyte chemotaxis).

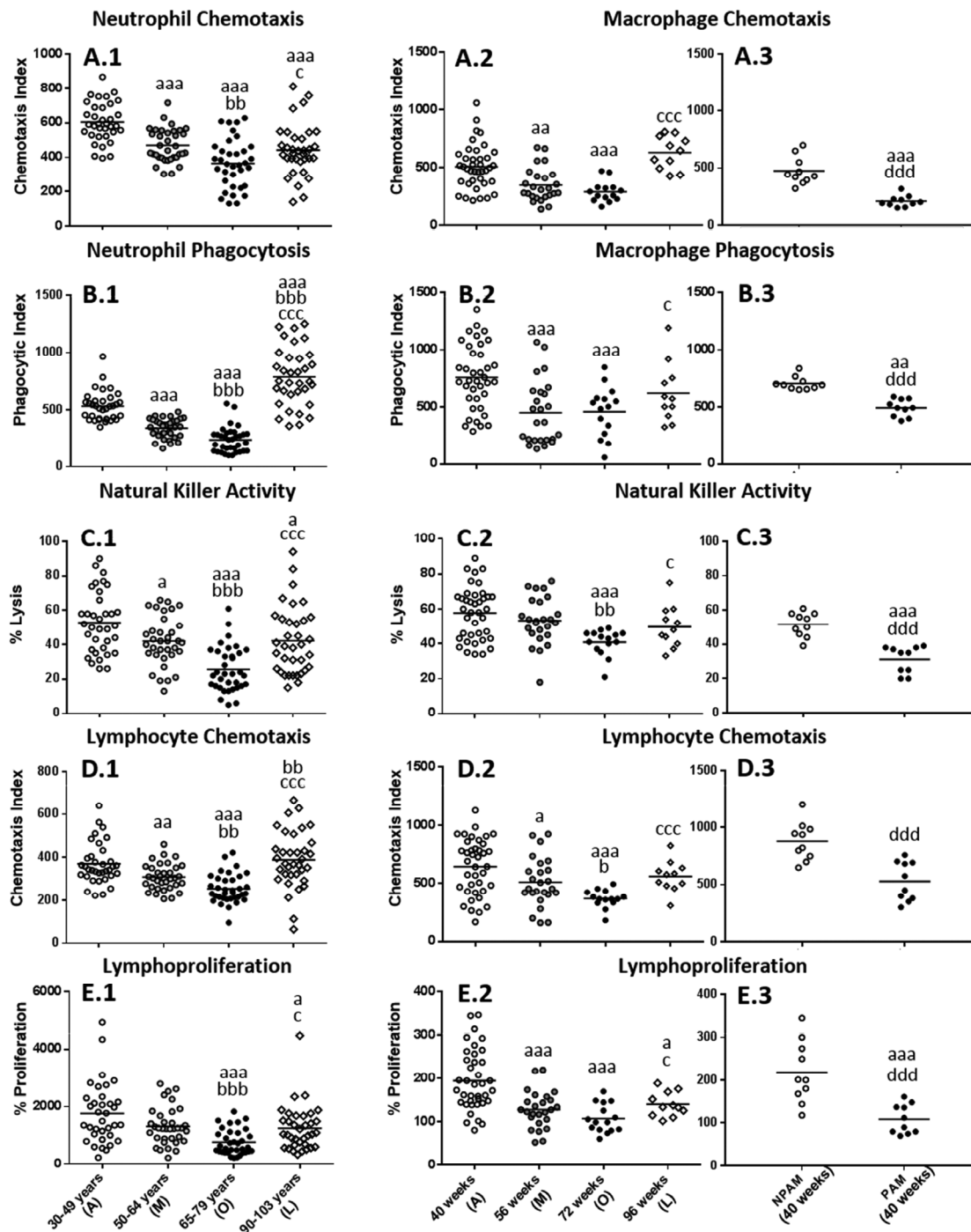


Figure 1. Age-related changes in immune functions in peripheral blood leukocytes from humans and in peritoneal leukocytes from mice. (A) Phagocytic Index: number of latex beads ingested per 100 human neutrophils (A.1) or mouse macrophages (A.2 and A.3); (B) Chemotaxis Index: number of phagocytes on the filter, human neutrophils (B.1) or mouse macrophages (B.2 and B.3); (C) NK cytotoxic activity (percentage of lysis of tumor cells) of human leukocytes (C.1) or mouse leukocytes (C.2 and C.3). (D) Chemotaxis Index: number of human lymphocytes on the filter (D.1) or mouse lymphocytes (D.2 and D.3); (E) Percentage of proliferation of lymphocytes in response to the mitogen Phytohaemagglutinin in the case of humans (E.1) and in response to Concanavalin A in the case of mice (E.2 and E.3). The results corresponding to peritoneal leukocytes from adult prematurely-aging mice (PAM) and non-prematurely-aging mice (NPAM) are shown in A.3, B.3, C.3, D.3, and E.3. A: Adult; M: Mature; O: Old; L: Long-Lived; a: $P < 0.05$; aa: $P < 0.01$; aaa: $P < 0.001$ with respect to the value in adults. b: $P < 0.05$; bb: $P < 0.01$; bbb: $P < 0.001$ with respect to the value in mature individuals. c: $P < 0.05$; cc: $P < 0.01$; ccc: $P < 0.001$ with respect to the value in old subjects. d: $P < 0.05$; dd: $P < 0.01$; ddd: $P < 0.001$ with respect to the value in NPAM.

Comparing to adults, human centenarians showed a higher phagocytosis ($P<0.001$) but lower neutrophil chemotaxis ($P<0.001$), NK activity and lymphoproliferation ($P<0.05$), whereas no statistically significant differences were found between centenarians and adults in lymphocyte chemotaxis. Long-lived mice also showed a significant increase in all the functions analyzed with respect to when they were old ($P<0.05$ in macrophage phagocytosis, NK activity and lymphoproliferation; $P<0.001$ in macrophage and lymphocyte chemotaxis). No statistically significant differences were found in mice between when they are adult and long-lived in macrophage chemotaxis and phagocytosis, NK activity and lymphocyte chemotaxis, whereas long-

lived mice showed a decrease in lymphoproliferation ($P<0.05$) with respect to the adult age.

With regard to the model of premature aging in mice, chronologically adult PAM showed lower values in all the immune functions analyzed ($P<0.001$) in relation to their adult NPAM counterparts (Fig. 1.A3 to Fig. 1.E3). Furthermore, in comparison to adult mice from the longitudinal study, PAM also showed significantly lower values ($P<0.001$) in chemotaxis of macrophages, NK activity and lymphoproliferation, as well as in phagocytosis ($P<0.01$). The values in PAM were similar to those observed in chronologically old mice. Moreover, PAM exhibited a shorter life span ($P<0.01$) than NPAM (Fig. 2).

Table 1. Pearson's correlation coefficients between the immune functions analyzed in human peripheral blood leukocytes and the age of the subjects.

	CORRELATION COEFFICIENT (<i>r</i>)	<i>P</i>
Neutrophil Chemotaxis	-0.632	0.000 ***
Neutrophil Phagocytosis	-0.711	0.000 ***
Natural Killer Activity	-0.589	0.000 ***
Lymphocyte Chemotaxis	-0.551	0.000 ***
Lymphoproliferation	-0.486	0.000 ***

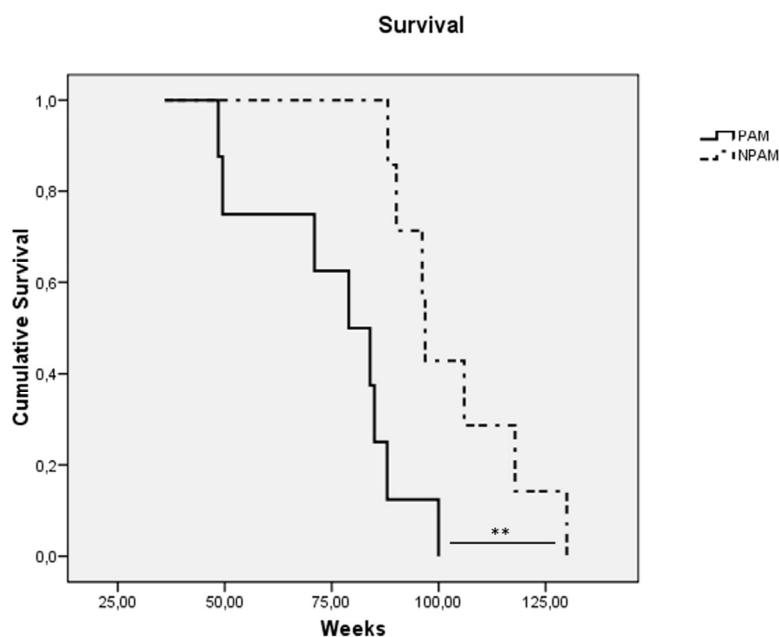


Figure 2. Kaplan-Meier cumulative survival of prematurely aging mice: PAM (solid line) and non-prematurely aging mice: NPAM (dashed line). **: $P < 0.01$.

DISCUSSION

Many efforts have been made to define the best means for measuring biological age, but considerable disagreement exists concerning the logical strategy for the selection criteria of the corresponding biomarkers. For example, cross-sectional designs can only indicate differences between age groups at a specific point in time. Therefore, in order to conclude that changes have occurred because of aging phenomena, longitudinal designs are needed [7]. In the present study, the selection of biomarkers of aging has been based on both cross-sectional data in humans (because it is very difficult to carry out a longitudinal study throughout aging in our species) and longitudinal data in mice. To our knowledge, this is the first study that combines results from humans and experimental animals as well as showing the results of a longitudinal study performed in mice, initiated at the adult age of 40 weeks (equivalent to 40 years in humans) until the natural death of the animals.

The immune system is relatively immature at birth and completes its development at the end of growth, which is during the second decade of life in human beings [26]. The brain is not fully mature until the early 20s [27, 28] and some hormones reach their peak at 25 years of age [29]. For these reasons, the decision to begin the study at the age of 30 years in humans, and the corresponding age in mice, was taken in order to ensure that all of the adult subjects had already developed a mature and competent immune system and had already begun the aging process.

With respect to the biological age markers chosen, these were relevant functions of the immune system. This physiological system is a complex mechanism of defense of the organism against the continual infectious processes and cancers to which we are submitted since birth. Moreover, this system is also involved in repairing the damage, and maintaining and restoring tissue integrity [30, 31]. To carry out all these functions, the immune system cells, phagocytes and lymphocytes, show a wide range of capacities, which constitute the so-called "immune response". However, the defensive role of the immune system is compromised during the aging process, since with the advance of age the number of tissue injuries in the body increases as well as the infection processes and cancers and consequently, the mechanisms of defense are more frequently required. In fact, almost every component of the immune system undergoes striking age-associated restructuring, leading to changes that may include enhanced as well as diminished functions. Some of these age-associated changes in immune functions, which constitute the denominated immunosenescence, have been linked to

longevity both in mice [25] and in humans [15-18, 32]. In this sense, the immune function parameters are the best choice to be biomarkers of biological age.

Although both innate and adaptive immunity suffer age-related changes, most studies in humans and mice have focused on the severe deterioration of adaptive immune response with age. Thus, aspects of innate immunity most typically studied such as phagocytosis and NK cell cytotoxicity, have been considered to remain relatively unaffected [17]. An aspect of the innate immune response such as mobility to the focus of infection following a chemical gradient (chemotaxis) has been hardly studied in this context. However, more recent work has shown that innate immunity is also very affected by aging [25, 33]. For this reason, and even though a few parameters of adaptive immunity have allowed the definition of the "immune risk phenotype" [19, 34], since they are very limited and have not been validated as markers of biological age, in the present study several relevant functions of innate immunity such as chemotaxis, phagocytosis and NK activity as well as other functions of adaptive immunity such as proliferation of lymphocytes, were chosen. Age-related changes in immune cell populations were not analyzed in this study. Even though the effectiveness of an immune response could be influenced by immune cell population changes (in terms of frequency or counts), the study of these changes could give incomplete information about the immune response capacity. Thus, an increase in the number of a specific immune cell type does not imply a better performance of these cells, but rather the opposite. In fact, it has been shown that there is an age-related increase in the number of CD3-CD56(+) NK cells, which has been explained by a compensatory mechanism towards the age-related loss of the functional capacity of these cells [35, 36].

This is the first study in which these functions have been validated as indicators of an individual's health and biological age. Thus, they were preserved in long-lived individuals (both human centenarians and extremely long-lived mice), which are expected to have withstood the detrimental effects of the aging process better than those individuals who do not live to extreme old age. In addition, mice, which at the adult age already have similar immune function values to those of chronologically old animals, achieve a shorter lifespan. Although this second aspect has not been addressed in humans, since the age-related evolution of these immune functions is similar in both mice and humans, it can be assumed that those humans showing immune parameters at the levels of older subjects have a higher biological age and consequently they will not live so long. In fact, the present study reveals that there is an age-related decline in the immune function parameters analyzed in both

human blood neutrophils and lymphocytes, as well as in peritoneal macrophages and lymphocytes from mice, with the lowest values in elderly humans (65-79 years of age) and old mice (72 weeks of age). This age-related decline was further supported by the strong negative correlation coefficients obtained in humans.

Recent studies have suggested that a big cohort of parameters is needed in order to accurately estimate the biological age [37]. The present study demonstrates that the five immune functions analyzed are valid enough to be used as indicators of an individual's health and remaining lifespan and therefore, are proposed as markers of biological age. In addition, these immune function parameters can be useful for the early identification of accelerated aging in humans, which may offer opportunities for prevention of age-related diseases and premature death. Furthermore, as the maintenance of health and consequently the rate of aging, principally depend on environment and lifestyle [16, 38], several strategies such as nutritional (caloric restriction or antioxidant administration) and physical exercise interventions, which can improve the immune response [39], are increasingly being used to slow down the aging process. However, as there is no accurate way of testing their effectiveness, the immune functions proposed in the present study will also be an aid for monitoring the effectiveness of such interventions. Moreover, due to the easy obtainability of the samples in which the immune parameters can be studied, our proposal will be very helpful in controlling health and promoting a healthy longevity.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 140 human volunteers (78 women; 62 men) between 30-103 years old were studied and divided into four different experimental groups: adult (30-49 years-old; 18 women and 17 men), mature (50-64 years-old; 18 women and 17 men), old (65-79 years-old; 18 women and 17 men) and long-lived subjects (90-103 years-old; 24 women and 11 men). All the participants are members of the Spanish population. The inclusion criteria were that the subject should be in a healthy condition (absence of pathology or findings of clinical significance in general laboratory parameters). All participants have given written consent for the use of their blood samples for the purposes of this study. All procedures were carried out according to the Declaration of Helsinki.

Experimental animal

Female ICR/CD1 ex-reproductive mice (*Mus musculus*) were used in this study. Animals were purchased from

Janvier Labs (Germany) at the adult age (32±4 weeks), and were placed and acclimatized in the Animal Facility at the Faculty of Biology (UCM). Mice were housed at 4-5 per cage and maintained in standard laboratory animal conditions for pathogens, temperature (22±2°C) and humidity (50-60%), on a 12/12 h reversed light/dark cycle (lights on at 20:00 h) to avoid circadian interferences. Mice had access to tap water and standard pellets (Panlab, Spain) *ad libitum*. One group of animals (n=40) was used for the longitudinal study. The collection of peritoneal suspensions was at the adult (40±4 weeks; n=38), mature (56±4 wk; n=25), old (72±4 wk; n=15) and long-lived (96±4 wk; n=11) ages. Another group of animals were classified as prematurely aging mice (PAM) (n=10) and non-prematurely aging mice (NPAM) (n=10) according to their different behavior in a T-maze, as previously described [23, 24]. After their classification, the collection of the peritoneal suspensions was only at the adult age (40±4 wk). All the experiments were approved by the Experimental Animal Committee of Complutense University of Madrid (UCM) (Spain) and were in accordance with the guidelines of the European Community Council Directives ECC/566/2015.

Classification of mice according to a model of premature aging: T-maze test

One week after their arrival and acclimation in the Animal Facility of the Faculty of Biology (UCM), one group of adult female ICR/CD1 mice (33±4 weeks) were classified as PAM and NPAM according to their different behavior in a T-maze, as previously described [23, 24]. This T-shaped maze essentially consists of three arms made of wood, whose internal surfaces are covered with black methacrylate. The inside dimensions of each arm are 10 cm wide, 25 cm long, and 10 cm high. The floor is made of 3 mm-thick cylindrical aluminum rods placed perpendicularly to the side walls. The test is performed by holding the mouse by the tip of its tail and placing it inside the "vertical" arm of the maze with its head facing the end wall. Its performance is evaluated with a chronometer to measure the time the animal takes to cross the intersection of the three arms with both hind legs. This test was carried out four times, once a week, to sort the PAM (that required > 10 s to complete exploration of the first arm at each test) from the NPAM (that completed the exploration in < 10 s in each test). Animals showing an intermediate response to the T-maze were removed from the study. Thus, we had two groups of animals: one group including the NPAM population (n=10) and another including the PAM population (n=10). This test was always performed between 09:00 and 11:00 h (to avoid circadian variations) under red light.

Collection of human blood samples and isolation of neutrophils and lymphocytes

Peripheral blood samples (10 mL) were collected using vein puncture and sodium citrate-buffered Vacutainer tubes (BD Diagnostic, Spain), between 9:00 to 10:00 a.m. to avoid circadian variations in immune parameters. Neutrophils and lymphocytes cells were isolated from whole blood following a previously described method [40], using 1.119 and 1.077 density Hystopaque (Sigma-Aldrich, Spain) for neutrophil and lymphocyte separation, respectively. Collected cells (95% of viability determined using trypan blue staining) were adjusted to the corresponding final concentrations for the development of each assay.

Collection of murine peritoneal leukocytes

Murine peritoneal suspensions were collected between 8.00 am and 10.00 a.m., to minimize circadian variations of the immune parameters studied. The use of peritoneal cell sample has the main advantage of not having to sacrifice the animals. Without using anesthesia, mice were held by cervical skin, the abdomen was cleansed with 70% ethanol (Sigma-Aldrich), and 2 ml of sterile Hank's solution, previously tempered at 37°C, was injected into the peritoneum [25]. After massaging the abdomen, approximately the 80% of injected volume was recovered by the needle employed for the injection of Hank's. Leukocytes from peritoneal suspensions were identified by their morphology (macrophages or lymphocytes) and quantified (number of cells/mL) in Neubauer chambers using optical microscopy (x40). Cellular viability, which was routinely checked before and after each experiment by the trypan blue (Sigma-Aldrich) exclusion test, was higher than 95±1% in all cases. The following studies were performed using unfractionated peritoneal leukocytes to better reproduce the *in vivo* situation. The peritoneal suspensions were adjusted to a specific number of macrophages, lymphocytes or total leukocytes, depending on the parameter analyzed as described in the corresponding section.

Chemotaxis

The induced mobility or chemotaxis of neutrophils, macrophages and lymphocytes was evaluated according to the method previously described [25, 40]. Cell suspensions were deposited in the upper compartment of a Boyden chamber separated by a filter of polycarbonate (3 µm of diameter; Merl-Millipore, Ireland). The number of cells (neutrophils, macrophages and lymphocytes) that migrated toward the chemoattractant agent, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP, 10⁻⁸ M, Sigma-Aldrich), deposited in the lower compartment of the

chamber, was counted in the lower face of the filter that separates the two compartments of the chamber. This number was expressed as Chemotaxis Index.

Phagocytosis

Phagocytosis of inert particles (latex beads, 1.1 µm diameter, Sigma-Aldrich) was assayed in phagocytes (neutrophils and macrophages) following a method previously described [25, 40]. Cell suspensions were incubated on migration inhibition factor (MIF) plates (Kartell, Noviglio, Italy) for 30 min at 37 °C in a humidified atmosphere. The adherent monolayers obtained were washed with pre-warmed PBS solution, and then 200 µl of Hank's solution and 20 µl of latex beads (1.1 µm diluted to 1% PBS, Sigma-Aldrich) were added. After 30 min of incubation under the same conditions, the plates were washed, fixed with methanol (50%) and stained with Giemsa's solution (Sigma-Aldrich). The number of particles ingested by 100 neutrophils or 100 macrophages was counted and this was expressed as Phagocytic Index.

Natural killer cytotoxicity

The natural killer (NK) cell cytotoxicity was evaluated following an enzymatic colorimetric assay (Cytotox 96 TM Promega, Boehringer Ingelheim, Germany) based on the determination of lactate dehydrogenase (LDH) released by the cytolysis of targets cells (human K562 lymphoma cells or murine YAC-1 lymphoma cells), using tetrazolium salts [25, 40]. The results were expressed as the percentage of tumor cells killed (% lysis).

Lymphoproliferation

The proliferation capacity of lymphocytes was evaluated by a standard method, previously described [25, 40]. The assay was assessed in both basal and stimulated conditions using mitogens [phytohemagglutinin (PHA) and concanavaline A (Con A), for humans and mice, respectively]. Cells suspensions were dispensed into 96-wells plates (Costar, Cambridge, MA, USA). 20 µl/well of complete medium, PHA or Con A (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) were added. After 48 h of incubation at 37°C in a sterile and humidified atmosphere of 5% CO₂, 2.5 µCi ³H-thymidine (Hartmann Analytic, Germany) were added to each well, followed by another incubation of 24 h. Cells were harvested in a semiautomatic harvester (Skatron Instruments, Norway) and thymidine uptake was measured in a beta counter (LKB, Uppsala, Sweden) for 1 min. The results were calculated as ³H-thymidine uptake (counts per minute, cpm) for basal and stimulated conditions, and were expressed as

lymphoproliferation capacity (%) giving 100% to the cpm in basal conditions.

Statistical analysis

SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA) was used for the statistical analysis of the results. All data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of the values corresponding to subjects, being each value the mean of duplicate assays. The normality of the samples and the homogeneity of variances were checked by the Kolmogorov–Smirnov and Levene analyses, respectively. Differences due to age were studied through Student's *t* test for independent samples. The *Pearson* correlation coefficient was used to test for correlation between parameters. Two-sided $P < 0.05$ was considered the minimum level of significance. Differences in life span were studied through the Kaplan-Meier test, with a minimum significance level (log rank, Mantel-Cox) also set at $P < 0.05$.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interests to declare.

FUNDING

This work was supported by grants of the Research group of UCM (910379), Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD12/0043/0018) and FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union.

REFERENCES

- Finkel D, Whitfield K, McGue M. Genetic and environmental influences on functional age: a twin study. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 1995; 50:104–13. doi: 10.1093/geronb/50B.2.P104
- Borkan GA, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol*. 1980; 35:177–84. doi: 10.1093/geronj/35.2.177
- Anstey KJ, Lord SR, Smith GA. Measuring human functional age: a review of empirical findings. *Exp Aging Res*. 1996; 22:245–66. doi: 10.1080/03610739608254010
- Mitnitski AB, Graham JE, Mogilner AJ, Rockwood K. Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr*. 2002; 2:1. doi: 10.1186/1471-2318-2-1
- Comfort A. Test-battery to measure ageing-rate in man. *Lancet*. 1969; 2:1411–14. doi: 10.1016/S0140-6736(69)90950-7
- Benfante R, Reed D, Brody J. Biological and social predictors of health in an aging cohort. *J Chronic Dis*. 1985; 38:385–95. doi: 10.1016/0021-9681(85)90134-1
- Nakamura E, Miyao K. A method for identifying biomarkers of aging and constructing an index of biological age in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62:1096–105. doi: 10.1093/gerona/62.10.1096
- Bae CY, Kang YG, Kim S, Cho C, Kang HC, Yu BY, Lee SW, Cho KH, Lee DC, Lee K, Kim JS, Shin KK. Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr*. 2008; 47:253–65. doi: 10.1016/j.archger.2007.08.009
- Bulpitt CJ, Antikainen RL, Markowe HL, Shipley MJ. Mortality according to a prior assessment of biological age. *Curr Aging Sci*. 2009; 2:193–99. doi: 10.2174/1874609810902030193
- Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, Harrington H, Israel S, Levine ME, Schaefer JD, Sugden K, Williams B, Yashin AI, et al. Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112:E4104–10. doi: 10.1073/pnas.1506264112
- Srettabunjong S, Satitsri S, Thongnoppakhun W, Tirawanchai N. The study on telomere length for age estimation in a Thai population. *Am J Forensic Med Pathol*. 2014; 35:148–53. doi: 10.1097/PAF.0000000000000095
- Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013; 14:R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
- Fulop T, Larbi A, Kotb R, de Angelis F, Pawelec G. Aging, immunity, and cancer. *Discov Med*. 2011; 11:537–50.
- Dewan SK, Zheng SB, Xia SJ, Bill K. Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly to infections. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125:3325–31.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol*. 1990; 45:M45–48. doi: 10.1093/geronj/45.2.M45
- De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des*. 2009; 15:3003–26. doi: 10.2174/138161209789058110
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a

- very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995; 50:B378–82. doi: 10.1093/gerona/50A.6.B378
18. Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, Nomura T. Natural killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997; 84:269–75. doi: 10.1006/clin.1997.4401
 19. DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*. 2006; 7:471–81. doi: 10.1007/s10522-006-9062-6
 20. Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2002; 37:249–56. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00190-5
 21. Guayerbas N, De La Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol*. 2003; 27:339–50. doi: 10.1016/S0145-305X(02)00103-9
 22. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol*. 2006; 80:219–27. doi: 10.1016/j.yexmp.2005.11.004
 23. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14:157–62. doi: 10.1159/000110640
 24. De la Fuente M. Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes: improvement of leucocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants. *Proc Nutr Soc*. 2010; 69:651–59. doi: 10.1017/S0029665110003848
 25. Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor kappa B. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010; 65:941–50. doi: 10.1093/gerona/gfq101
 26. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*. 2015; 282:20143085. doi: 10.1098/rspb.2014.3085
 27. Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Jernigan TL, Toga AW. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat Neurosci*. 1999; 2:859–61. doi: 10.1038/13154
 28. Giedd JN. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1021:77–85. doi: 10.1196/annals.1308.009
 29. Leowattana W. DHEA(S): the fountain of youth. *J Med Assoc Thai*. 2001 (Suppl 2); 84:S605–12.
 30. Vénereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol*. 2015; 6:422. doi: 10.3389/fimmu.2015.00422
 31. Bauer ME, Fuente ML. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 2016; 158:27–37. doi: 10.1016/j.mad.2016.01.001
 32. Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, de la Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc*. 2008; 56:2244–51. doi: 10.1111/j.1532-5415.2008.02018.x
 33. De la Fuente M. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15:213–23. doi: 10.1159/000156465
 34. Pawelec G. Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol*. 2006; 41:1239–42. doi: 10.1016/j.exger.2006.09.005
 35. Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*. 2000; 18:1613–20. doi: 10.1016/S0264-410X(99)00495-8
 36. Hazeldine J, Lord JM. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev*. 2013; 12:1069–78. doi: 10.1016/j.arr.2013.04.003
 37. Bürkle A, Moreno-Villanueva M, Bernhard J, Blasco M, Zondag G, Hoeijmakers JH, Toussaint O, Grubeck-Loebenstein B, Mocchegiani E, Collino S, Gonos ES, Sikora E, Gradinaru D, et al. MARK-AGE biomarkers of ageing. *Mech Ageing Dev*. 2015; 151:2–12. doi: 10.1016/j.mad.2015.03.006
 38. Kirkwood TB. Gerontology: healthy old age. *Nature*. 2008; 455:739–40. doi: 10.1038/455739a
 39. De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des*. 2011; 17:3966–93. doi: 10.2174/138161211798764861
 40. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several

ARTÍCULO 1

immune functions in elderly men and women. Free
Radic Res. 2008; 42:272–80.
doi: 10.1080/10715760801898838

Original Article

Redox Parameters as Markers of the Rate of Aging and Predictors of Life Span

Irene Martínez de Toda, MSc,^{1,2} Carmen Vida, PhD,^{1,2} Antonio Garrido, PhD,^{1,2,*} and Mónica De la Fuente, PhD, MD^{1,2,*}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain. ²Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain.

*Address correspondence to: Mónica De la Fuente, PhD, MD, Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mondela@bio.ucm.es

Received: October 25, 2018; Editorial Decision Date: January 24, 2019

Decision Editor: Rozalyn Anderson, PhD

Abstract

Oxidative stress has been reported to increase with aging, and although several age-related changes in redox parameters have been described, none of them have been verified as markers of the rate of aging and life span. Therefore, antioxidant (catalase, glutathione peroxidase, reductase activities, and reduced glutathione) and oxidant (oxidized glutathione, basal superoxide anion, and malondialdehyde concentrations) parameters were studied in whole blood cells from humans divided into different age groups (adult, mature, older adult, nonagenarian, and centenarian) in a cross-sectional study. Moreover, the same parameters were investigated in peritoneal leukocytes of mice at the analogous human ages (adult, mature, old, very old, and long-lived) in a longitudinal study as well as in adult prematurely aging mice. The results reveal that the age-related alterations of these markers are similar in humans and mice, with decreased antioxidants and increased oxidants in old participants, whereas long-lived individuals show similar values to those in adults. In addition, adult prematurely aging mice showed similar values to those in chronologically old mice and had a shorter life span than nonprematurely aging mice. Thus, these parameters could be proposed as markers of the rate of aging and used to ascertain biological age in humans.

Keywords: Antioxidants, Oxidants, Longevity, Biological age markers, Oxidative stress

The free radical theory of aging was initially proposed by Harman (1) and then modified and eventually merged with the “oxidative stress theory of aging,” which postulates that if free radicals cause a stress that cells can cope with, then damage will not occur because antioxidant defenses will overwhelm such stress. Age-associated damage will take place only when there is a shift in the pro-oxidant/antioxidant balance in favor of the former (2). Nowadays, this theory is highly controversial due to the appearance of studies showing that an increase in reactive oxygen species (ROS) generation, in some cases, increases longevity (3,4). Nevertheless, this outcome could be due to a hormetic response. Thus, a continued exposure to mild levels of ROS can activate stress response pathways that will increase expression of antioxidant enzymes, increasing metabolic health and life span, as has been previously suggested (5). Other evidence against the theory comes from epidemiological studies showing that antioxidant supplementation did not lower the incidence of many age-associated diseases but, in some cases, increased the risk of

death, as reviewed in [6]. However, it has to be taken into account that a reductive stress can also lead to damage (7). Another explanation is that by giving powerful antioxidants, one may hamper the useful adaptations to oxidative stress (8). Nevertheless, higher oxidative stress markers have been reported in different tissues from old participants in several species (9,10) and humans (11,12). In addition, the participation of oxidative stress in several age-related diseases, including cardiovascular disease, atherosclerosis, arthritis, diabetes, neurodegenerative disorders, and cancer, has been observed (13,14). However, data from healthy humans along the aging process are scarce and sometimes inconsistent (15,16). Moreover, most of the research relies on cross-sectional data, given the difficulty of following-up humans during the whole aging process, and therefore, it cannot be concluded that the perceived changes are due to aging. In addition, there are not many studies that include long-lived individuals. By their ability to surpass average life expectancy, naturally long-lived participants would be expected to have endured the ad-

verse effects of aging more advantageously than who do not reach extreme old ages (17). Therefore, the study of such individuals may provide important insights into the process of aging.

The fact that some participants live until extreme ages and others do not brings up another important characteristic of aging: that it is heterogeneous, which means that not every single individual ages at the same rate, this being the reason why the idea of biological age emerged (18,19). Therefore, the biological age of a participant would indicate his/her aging rate and would be more indicative of his/her active life expectancy than chronological age (20). However, despite the attempts to identify reliable biomarkers that will indicate the aging rate, this aim has not been achieved yet (21). An additional problem is the need to find easy to measure, reproducible and noninvasive biomarkers. Given the oxidative stress basis of aging, it is possible to think that several redox markers known to experience an age-related increase or decrease could be used as biomarkers of the rate of aging. However, to be valid as a biomarker of aging, a given parameter has to meet two conditions: The first one being that a long-lived individual, which has reached that age as a result of maintaining a healthy aging, should have a value of this parameter similar to that of an adult. The second being that if an adult individual shows a parameter with a value typical of old individuals, he/she should live a shorter time than the ones that keep that value within the adult range (1,22).

Therefore, the goal of our study was to investigate whether several redox parameters could be validated as markers of the aging rate in humans. For this purpose, peripheral blood was selected as a sample of study because it reflects the redox balance of other tissues (23) and because it is the easiest sample to collect in the clinical scenario. Thus, antioxidant (catalase [CAT], glutathione peroxidase [GPx], glutathione reductase [GR] activities, and reduced glutathione [GSH] concentrations) as well as pro-oxidant (oxidized glutathione [GSSG] concentrations, GSSG/GSH ratios, malondialdehyde [MDA], and basal superoxide anion [$O_2^{\bullet-}$] concentrations) parameters were analyzed in human whole blood cells in a cross-sectional study, including individuals from 30 to 103 years old. In addition, a longitudinal study was accomplished in mice, in which animals were tracked individually until they died. The same parameters were, therefore, investigated at the analogous human ages in mice to validate them as predictors of life span. Because in mice it was not feasible to obtain enough blood to make all the desired measurements, peritoneal leukocytes were chosen. Peritoneal leukocytes represent an interesting sample type given that they can be extracted without killing the mice, enabling a longitudinal study to be performed. In addition, it has been demonstrated that the redox balance of peritoneal leukocytes reflects that of other tissues in mice (24) and that the age-related function decline experienced by peritoneal leukocytes in mice reflects that experienced by human leukocytes (22). In addition, to further validate these parameters as predictors of life span, they were also investigated in a model of premature aging mice (PAM) based on an inappropriate reactivity to stress. These PAM, at the adult age, show premature immunosenescence (22), premature frail state (25), higher oxidative stress levels in spleen and brain (26), and shorter life span compared with their exceptional nonprematurely aging mice (E-NPAM) counterparts of the same sex and chronological age (reviewed in ref. (27)).

Methods

Participants

The study was accomplished on 145 healthy individuals (64 men and 81 women). All individuals are part of the Spanish population. These participants were split into five groups. The adult group

comprised 35 participants (17 men and 18 women) aged between 30 and 49 years. The mature group comprised 43 participants (21 men and 22 women) aged between 50 and 64 years. The older adult group comprised 31 participants (15 men and 16 women) aged 65–79 years. The nonagenarian group comprised 31 participants (10 men and 21 women) aged between 90 and 99 years, and the centenarian group comprised 5 participants (1 man and 4 women) aged 100–103 years. The inclusion criterion was that the individual should be in healthy condition (absence of disease and of unusual values in routine laboratory parameters). All participants gave informed consent, and all procedures followed the guidelines of the Helsinki Declaration.

Mice

The study was carried out with outbred ICR/CD1 female mice (*Mus musculus*), acquired from Janvier Labs (Germany) when they were 32 ± 4 weeks old and placed in the Animal Facility located at the Faculty of Biology (Complutense University of Madrid, UCM). Female mice were used for this study because male mice show aggressive and dominant behavior when caged together and it has been shown that social isolation causes alterations in the neuroimmunoenocrine communication (28). Mice were in groups of four to five per cage and kept at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity (50%–60%), on a 12/12 hours reversed light/dark cycle. Mice had access to standard pellets (Panlab, Spain) and tap water ad libitum. One group of animals ($n = 40$) was monitored longitudinally. Maximal life span was 136 weeks, whereas the average life span was 70 weeks. The 40-week-old animals come from the flat part of the longevity curve so we can consider these animals, adult mice. By contrast, the 56-week-old animals come from the survival curve where mortality has already affected about 20% of the animals so we can consider them mature mice, and the 72-week-old animals come from the survival curve where more than 50% of the animals have died so we can consider them old mice. Extraction of peritoneal leukocytes was performed at the adult ($n = 38$; 40 ± 4 weeks), mature ($n = 25$; 56 ± 4 weeks), old ($n = 15$; 72 ± 4 weeks), very old ($n = 11$; 96 ± 4 weeks), and long-lived ($n = 3$; 120 ± 4 weeks) ages. Another group of mice were categorized depending on their behavior in a T-maze test, in PAM ($n = 10$) and E-NPAM ($n = 10$) as it is described previously. In these groups, extraction of the peritoneal suspensions was only performed at the adult age (40 ± 4 weeks). All the procedures were approved by the Experimental Animal Committee of UCM (Spain) and followed the guidelines of the European Community Council Directives ECC/566/2015.

Classification of Mice in PAM and E-NPAM Using the T-Maze Test

Female outbred ICR/CD1 mice (33 ± 4 weeks) were submitted to the T-maze and depending on their behavior were sorted as PAM and E-NPAM, following a previously published procedure (25). The T-shaped maze is composed of three wooden arms (each 10 cm wide; 25 cm long; 10 cm high) covered with black methacrylate. The floor consists of cylindrical aluminum rods. The test is initiated by placing the mouse (holding it by its tail) inside the base of the “T” facing the end wall. The time that each mouse took to cross the junction of the “T” was measured. This test was performed once per week during 1 month to divide the PAM (which required > 10 seconds to cross the junction at each test) from the E-NPAM (that completed the exploration in < 10 seconds in each test). Those mice that showed an intermediate response to the T-maze (requiring less than 10 seconds

sometimes and others more than 10 seconds) were not taken into account in this study. This test was always performed on red light between 09:00 and 11:00 hours.

Extraction of Human Blood Samples and Isolation of Neutrophils and Lymphocytes

Blood samples were obtained using sodium citrate as anticoagulant. Whole blood cells (including erythrocytes and total leukocytes) were obtained as previously described (29). Aliquots of peripheral blood were diluted 1:1 in RPMI 1,640 (Gibco, Canada) and were incubated 4 hours at 37°C in a saturated atmosphere of humidity and CO₂. After centrifugation at 900g 10 minutes, plasma was removed and whole blood cell pellets were stored at -80°C until used. Isolation of polymorphonuclear neutrophils and mononuclear (principally lymphocytes) cells was accomplished using 1.119 (neutrophil) and 1.077 (lymphocyte) density Hystopaque (Sigma-Aldrich, Spain), as previously described (19). Collected cells were adjusted to the corresponding final concentrations for the development of each assay.

Extraction of Peritoneal Leukocytes From Mice

Murine peritoneal leukocytes were extracted between 8.00 and 10.00 a.m. to avoid differences due to circadian variations. Mice were immobilized by cervical skin, and 2 mL of Hank's solution at 37°C was injected into the peritoneum (22). The abdomen of the mouse was massaged, and Hank's solution containing peritoneal leukocytes was recovered. Leukocytes were quantified using Neubauer chambers and adjusted to 10⁶ cells/mL in Hank's solution. Unfractionated peritoneal leukocytes were chosen for the following assays to better resemble the *in vivo* situation.

Catalase Activity

CAT activity was quantified as previously reported by Beers and Sizer (30), with the following modifications. Peritoneal leukocytes and whole blood cells were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4, 50 mM). Then, they were sonicated, and after centrifugation at 3,200g for 20 minutes, supernatants were obtained. H₂O₂ (14 mM) was used as substrate. Human supernatants were diluted 1:1,000 prior the assay. The reaction was calculated by following the absorbance decline at 240 nm over 80 seconds. In the same samples, protein concentration was calculated (BCA protein assay kit; Sigma-Aldrich), and the results are expressed as units (U) of CAT activity per milligram of protein.

Glutathione Peroxidase Activity

GPx activity was analyzed by using a previous method (31) with some modifications. Peritoneal leukocytes and whole blood pellets were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4, 50 mM). Then, they were sonicated, and after centrifugation at 3,200g at 4°C for 20 minutes, supernatants were collected. Human supernatants were diluted 1:30 prior the assay. Cumene hydroperoxide was used as substrate (cumene-OOH; Sigma). The activity was followed measuring the absorbance decline at 340 nm over 5 minutes. Protein concentration was calculated as described previously. The results are expressed as units (U) of GPx activity per milligram of protein.

Glutathione Reductase Activity

GR activity was analyzed following a method previously described (32). Peritoneal leukocytes and whole blood cells were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4, 50 mM). Then, they were sonicated, and after centrifugation at 3,200 g at 4°C for 20 minutes,

supernatants were collected. Human supernatants were diluted 1:5 prior the assay. GSSG (80 mM) was used as substrate and, by following the absorbance decline at 340 nm over 5 minutes, the activity was calculated. Protein concentration was evaluated as described previously. The results are expressed as units (U) of GR per milligram of protein.

Glutathione Concentration

Both GSH and GSSG were measured following a fluorometric assay (33). This method relies on the reaction capacity that glutathione (both GSSG and GSH) shows with o-phthalaldehyde (OPT), at pH 12 and pH 8, respectively, forming a fluorescent compound. Peritoneal leukocytes and whole blood cells were resuspended in phosphate buffer (pH 8 50 mM, EDTA 0.1 M). Then, samples were sonicated, 7.5 µL of HClO₄ (60%) were added and they were centrifuged 10 minutes at 9,500g. Ten microliters from supernatants was dispensed into 96 black plates. For GSSG quantification, N-ethylmaleimide (NEM, 0.04 M) was added to samples to prevent oxidation of the existing GSH into GSSG during sample preparation. OPT was dispensed into each well, and after 15-minute incubation, fluorescence was measured at 420 nm. Protein concentration was calculated as described previously. Results are expressed as nmol of GSSG/mg protein or GSH/mg protein. In addition, GSSG/GSH ratio was calculated for each sample.

Intracellular Superoxide Anion Concentration

The quantification of intracellular superoxide anion was performed following a method described previously (34). Murine peritoneal suspensions or human isolated neutrophils were adjusted to 10⁶ macrophages or neutrophils/mL and mixed with nitroblue tetrazolium (1 mg/mL). After 60-minute incubation, the reaction was stopped using HCl 0.5 M (Sigma-Aldrich). Samples were centrifuged at 1,600g for 30 minutes, supernatants were removed, and dioxin was used to extract the intracellular reduced nitroblue tetrazolium. Absorbance of the supernatants was quantified at 525 nm. The results are expressed as nmol O₂⁻/10⁶ macrophages or neutrophils by extrapolating from a standard curve of nitroblue tetrazolium reduced with 1,4-dithioerythritol (Sigma-Aldrich).

Malondialdehyde Concentration

Quantification of MDA was achieved using the commercial kit "Lipid peroxidation (MDA) Assay Kit" (Biovision). To prevent further formation of MDA during the preparation of the sample or during the heating step, the antioxidant butylated hydroxytoluene was added to the lysis buffer with a final concentration of 0.1 mM. Briefly, peritoneal leukocytes and whole blood cells were resuspended in 300 µL of MDA lysis buffer (containing butylated hydroxytoluene), sonicated, and centrifuged at 13,000g for 10 minutes. Supernatants were collected, mixed with thiobarbituric acid, and incubated in a water bath at 95°C for 60 minutes. Then, after centrifugation at 130,00g for 10 minutes, supernatants were obtained, added into a 96-well plate, and absorbance at 532 nm was measured. Protein concentrations were calculated as described previously. Results are expressed as nmol MDA per milligram protein.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the results was performed with SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL) software. Normality of the samples and homogeneity of variances were checked by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Two-way analysis of variance followed by

post hoc analysis was used to investigate differences due to age and sex in human samples, whereas one-way analysis was performed to investigate differences due to age in mice samples. The Tukey test and Games–Howell analysis were used for post hoc comparisons when variances were homogeneous and nonhomogeneous, respectively. Two-sided $p < .05$ was considered the minimum level of significance. Principal component analysis was performed including all redox parameters analyzed in humans. The number of components retained was based on eigenvalues (the amount of the total variance that is explained by each component) of 1 or greater. A varimax rotation was used to obtain a set of independent and best interpretable components. Differences in life span were studied through the Kaplan–Meier test, with a minimum significance level (log rank, Mantel–Cox) also set at $p < .05$.

Results

First, to validate several redox parameters as markers of the aging rate and predictors of longevity, these parameters were analyzed in human blood from different age groups. The data from both men and women are shown together given that the results from two-way ANOVA were not statistically significant for sex neither the interaction of sex and age. CAT (sex: $F = 0.049$; $p = .825$; age–sex: $F = 0.428$; $p = .788$), peroxidase (sex: $F = 0.497$; $p = .482$; age–sex: $F = 0.068$; $p = .091$), reductase (sex: $F = 1.480$; $p = .226$; age–sex: $F = 0.684$; $p = .605$), GSH (sex: $F = 0.001$; $p = .970$; age–sex: $F = 0.741$; $p = .566$), GSSG (sex: $F = 0.544$; $p = .462$; age–sex: $F = 0.389$; $p = .816$), GSSG/GSH (sex: $F = 0.335$; $p = .564$; age–sex: $F = 0.101$; $p = .982$), MDA (sex: $F = 0.798$; $p = .373$; age–sex: $F = 1.123$; $p = .349$), and superoxide anion (sex: $F = 0.234$; $p = .630$; age–sex: $F = 0.145$; $p = .965$). Regarding the age-related variations in antioxidant defenses in humans (Figure 1A–D), old individuals showed lower CAT activity, GSH concentration, GPx, and GR activities than adult individuals ($p < .05$ in GPx; $p < .01$ in GSH; $p < .001$ in CAT and GR) and also lower than mature individuals ($p < .01$ in CAT; $p < .001$ in GR and GSH). These lower antioxidant mechanisms were also noticed in mature participants compared with adults ($p < .05$ in CAT and GPx; $p < .001$ in GR). By contrast, nonagenarians showed higher antioxidant enzyme activities and concentrations than old individuals ($p < .01$ in GPx; $p < .001$ in all others), higher than mature individuals ($p < .05$ in GSH; $p < .01$ in CAT) and even higher than adults ($p < .01$ in CAT). Moreover, centenarians showed higher antioxidant markers than nonagenarians ($p < .05$ in GR), higher than old individuals ($p < .01$ in all of them), higher than mature individuals ($p < .05$ in CAT, GSH, and GR) and higher than adult individuals ($p < .05$ in CAT and GR).

Regarding pro-oxidant parameters (Figure 1E and F), older adult individuals showed higher GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios than adult and mature participants ($p < .001$), and mature participants higher than adults ($p < .001$). By contrast, long-lived participants (nonagenarians and centenarians) showed lower GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios compared with the mature and old groups ($p < .001$).

Second, MDA concentration was measured in whole blood and in isolated neutrophils and lymphocytes from humans, as well as in peritoneal leukocytes from mice. Regarding MDA concentration in whole blood (Figure 2A), older adult individuals had higher MDA concentrations than adult ($p < .001$) and mature ($p < .05$) participants. By contrast, nonagenarians and centenarians had lower MDA concentrations than mature and old individuals ($p < .001$). Similarly, in isolated neutrophils (Figure 2B), a higher concentration was

found in old participants compared with adults ($p < .05$), whereas a lower one was found in long-lived participants compared with the old group ($p < .01$). However, in isolated lymphocytes (Figure 2C), only the centenarian group showed lower concentration than older adult participants ($p < .05$).

In addition, with respect to the results from mice (Figure 2D), there is a tendency toward an age-related increase in MDA concentration, although no statistically significant differences were found due to the high interindividual variation. But again, long-lived mice showed a decreased MDA concentration compared with when they were old ($p < .01$). Regarding the model of PAM, leukocytes of chronologically adult PAM showed higher MDA concentrations ($p < .001$) than those of their adult E-NPAM counterparts and higher than the group of adult mice in the longitudinal study ($p < .05$).

In addition, to check whether the amount of a free radical such as the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) showed similar age-related variations in immune cells from humans and mice, we studied these changes in human neutrophils and in peritoneal leukocytes from mice. Regarding human neutrophils (Figure 3A), mature and older adult individuals showed higher $O_2^{\cdot-}$ concentrations than adults ($p < .001$). Nonagenarians also showed higher $O_2^{\cdot-}$ concentrations than adults ($p < .01$) but lower ones than mature ($p < .01$) and old ($p < .001$) individuals. Centenarians showed a comparable concentration to those from adults and lower ones than mature ($p < .05$) and old ($p < .01$) participants. Following the same pattern, leukocytes

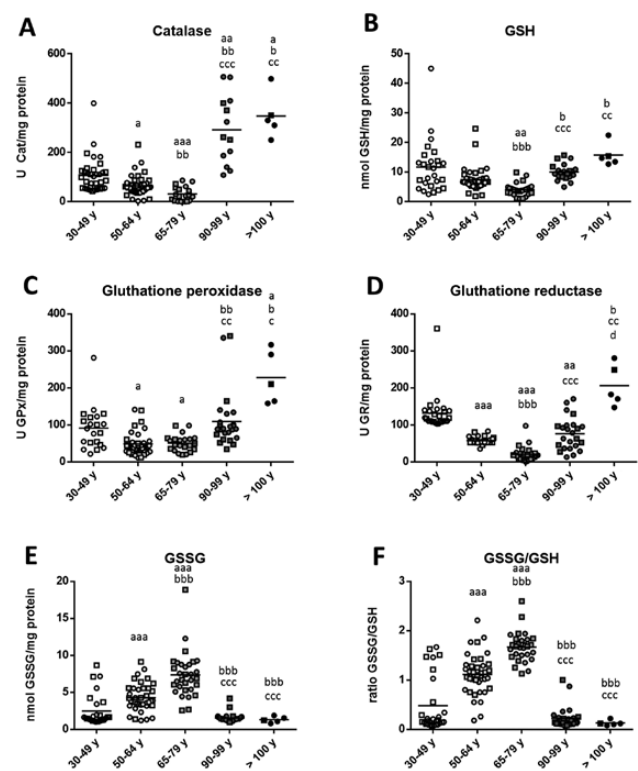


Figure 1. Age-related changes in (A) catalase activity, (B) reduced glutathione (GSH) concentration, (C) glutathione peroxidase activity, (D) glutathione reductase activity, (E) oxidized glutathione (GSSG) concentration, and (F) GSSG/GSH ratio in human whole blood. Statistical differences were analyzed through two-way ANOVA. $a p < .05$; $aa p < .01$; $aaa p < .001$ compared with the values in adults (30–49 y old). $b p < .05$; $bb p < .01$ compared with the values in mature individuals (50–64 y old). $c p < .05$; $cc p < .01$ compared with the value in old individuals (65–79 y old). $d p < .05$ compared with the values in nonagenarians (90–99 y old). Circles: women; squares: men.

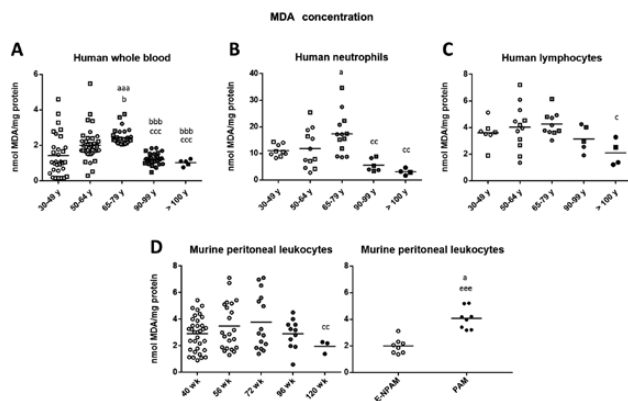


Figure 2. Age-related changes in malondialdehyde (MDA) concentration in (A) human whole blood, (B) isolated human neutrophils, (C) isolated human lymphocytes, and (D) murine peritoneal leukocytes. E-NPAM = exceptional nonprematurely aging mice 40 wk old. PAM = prematurely aging mice 40 wk old. Statistical differences were analyzed through one-way ANOVA. ^a*p* < .05; ^{aaa}*p* < .001 with respect to the value in adults (30–49 y old in humans; 40 wk old in mice). ^{bbb}*p* < .001 with respect to the value in mature individuals (50–64 y old in humans). ^c*p* < .05; ^{cc}*p* < .01 with respect to the value in old individuals (65–79 y old in humans; 72 wk old in mice). ^{ccc}*p* < .001 with respect to the value in E-NPAM. Circles: women; squares: men.

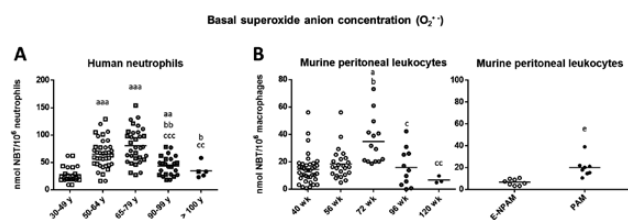


Figure 3. Age-related changes in basal superoxide anion concentration in (A) isolated human neutrophils, (B) peritoneal leukocytes of mice. E-NPAM = exceptional nonprematurely aging mice 40 wk old. PAM = prematurely aging mice 40 wk old. Statistical differences were analyzed through one-way ANOVA. ^a*p* < .05; ^{aaa}*p* < .001 compared with the value in adults (30–49 y old in humans; 40 wk old in mice). ^b*p* < .05; ^{bb}*p* < .01 compared with the value in mature individuals (50–64 y old in humans; 56 wk old in mice). ^c*p* < .05; ^{cc}*p* < .01; ^{ccc}*p* < .001 compared with the value in old individuals (65–79 y old in humans; 72 wk old in mice). ^a*p* < .05 compared with the value in E-NPAM. Circles: women; squares: men.

from old mice exhibited increased $O_2^{\bullet -}$ concentration compared with when they were adult and mature (*p* < .05). By contrast, very old and long-lived mice exhibited decreased $O_2^{\bullet -}$ concentrations compared with when they were old (*p* < .05 and *p* < .01, respectively). In addition, leukocytes of PAM exhibited higher $O_2^{\bullet -}$ concentrations than these cells of their adult E-NPAM counterparts (*p* < .05).

To ascertain whether there is a specific redox signature depending on the age of the individuals, principal component analysis was performed, including all redox parameters investigated in human whole blood. Principal component analysis resulted in two eigenvalues greater than 1. The Kaiser–Meyer–Olkin measure of sampling adequacy test was 0.811. The observed significance level of Bartlett’s test of sphericity was 0.000. The two components explained 57% of the total variance data (46% Component 1 and 11% Component 2). Five variables (GSSG = 0.716, GSSG/GSH = 0.751, MDA = 0.541, superoxide anion = 0.696, and GSH = –0.579) loaded highest on the first component (Component 1 = “oxidant component”) and the other three variables (CAT = 0.657, GPx = 0.891, and GR = 0.798) loaded



Figure 4. Human redox signature of aging and longevity. Principal component analysis sorted all redox variables into two components, explaining 57% of the total variance (46% Component 1 and 11% Component 2). Component 1 = “oxidant component” consists of five variables (oxidized glutathione [GSSG] = 0.716, GSSG/GSH = 0.751, reduced glutathione = 0.541, superoxide anion = 0.696, and reduced glutathione [GSH] = –0.579), and Component 2 = “antioxidant component” consists of three variables (catalase = 0.657, glutathione peroxidase = 0.891, and glutathione reductase = 0.798).

highest on the second component (Component 2 = “antioxidant component”). Principal component scores were calculated for each individual and plotted on a graph (Figure 4). It is shown that adult, mature, and old individuals display a different redox signature. Although there is some overlapping, mature participants show a higher score in the oxidant component than adult whereas old individuals a higher one than mature. Strikingly, nonagenarians display a similar redox signature to adults whereas centenarians exhibit a unique redox signature due to their high antioxidant enzymatic activities.

To validate the potential use of these markers as predictors of life span, the same parameters were investigated in peritoneal leukocytes from mice throughout their aging process as well as in adult prematurely aging mice (PAM). Regarding the age-related alterations in antioxidant defenses experienced in mice (Figure 5A–D), old mice exhibited decreased CAT, GPx, and GR activities as well as decreased GSH concentrations compared with when they were adults (*p* < .05). This decrease was already noticeable in mature mice compared with when they were adults in GR (*p* < .001). Very old mice showed decreased CAT activity and GSH concentrations (*p* < .05) but showed enhanced GR activity compared with when they were mature and old (*p* < .05). Long-lived mice showed increased GPx and GR activities and GSH concentrations compared with when they were old (*p* < .05) and increased GR activity compared with when they were mature (*p* < .05).

Regarding pro-oxidant compounds (Figure 5E and F), it was shown that old mice experience an increase in GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios compared with when they were adults (*p* < .05 and *p* < .001, respectively) and compared with when they were mature in GSSG/GSH ratios (*p* < .05). By contrast, long-lived mice exhibited decreased GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios compared with when they were old (*p* < .05 and *p* < .01, respectively).

Chronologically, adult PAM exhibited lower CAT and GR activities and GSH concentration than their adult E-NPAM counterparts (*p* < .01 in CAT and GSH, *p* < .001 in GR) and lower than the group of adult mice from the longitudinal study (*p* < .001 in CAT and GR;

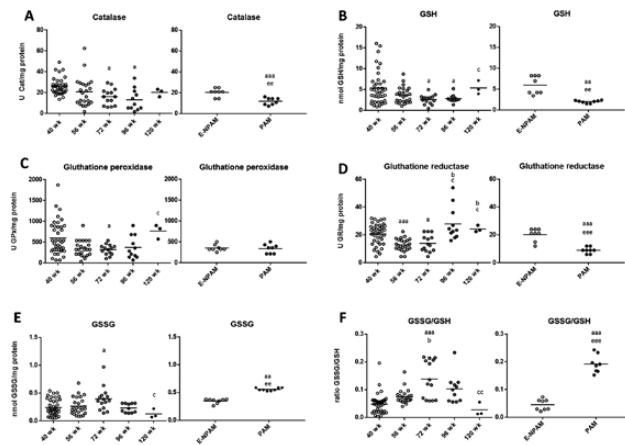


Figure 5. Age-related changes in (A) catalase activity, (B) reduced glutathione (GSH) concentration, (C) glutathione peroxidase activity, (D) glutathione reductase activity, (E) oxidized glutathione (GSSG) concentration, and (F) GSSG/GSH ratio in peritoneal leukocytes from mice. E-NPAM = exceptional nonprematurely aging mice 40 wk old. PAM = prematurely aging mice 40 wk old. Statistical differences were analyzed through one-way ANOVA. ^a $p < .05$; ^{ab} $p < .01$; ^{abc} $p < .001$ compared with the value in adult mice (40 wk old). ^b $p < .05$ compared with the value in mature mice (56 wk old). ^c $p < .05$; ^{cc} $p < .01$ compared with the value in old mice (72 wk old). ^{ab} $p < .01$; ^{abc} $p < .001$ compared with the value in E-NPAM.

$p < .01$ in GSH). Moreover, these PAM exhibited higher concentration of GSSG and higher GSSG/GSH ratio than their adult E-NPAM counterparts ($p < .01$ and $p < .001$, respectively) and that the adult group of mice from the longitudinal study ($p < .01$ in GSSG; $p < .001$ in GSSG/GSH). Thus, PAM, despite being adults, have similar values to the ones observed in old mice in CAT and GR activities, GSH, GSSG, MDA concentrations, and GSSG/GSH ratios, and they exhibit a shorter life span ($p < .01$) than E-NPAM (Figure 6), which have typical values of adult mice.

Discussion

There is substantial proof that demonstrates the connection between several markers, such as physiological (blood pressure), molecular (telomere length) or genetic (epigenetic clock), and age (recently reviewed in ref. (35)). However, to use them as markers of the rate of aging, they still have to be validated as predictors of remaining life span (1,22). Moreover, most of the research performed in this area has been solely based on data obtained from cross-sectional studies, which do not prove that the observed changes are due to aging (36). In addition, most of the proposed parameters have not been demonstrated to work in experimental animals such as mice, which is one of the established requirements in the search for biomarkers of the aging rate proposed by the American Federation of Aging Research (AFAR) and the MARK-AGE study (21,37).

In this study, it was demonstrated that antioxidant defenses (such as CAT, GPx, GR, and GSH) experience an age-related decrease, whereas oxidant and oxidative stress-derived compounds (such as GSSG, GSSG/GSH ratio, $O_2^{\cdot-}$, and MDA) experience an age-related increase until average life span is reached. Interestingly, individuals who surpass this age show a better redox status than mature and older adult individuals, displaying higher antioxidant defenses and lower oxidative compounds than the old group. This was shown to happen both in human blood (using a cross-sectional study) and in murine peritoneal leukocytes (using a longitudinal study), the latest proving that the age-related alterations detected are in fact due to aging. It

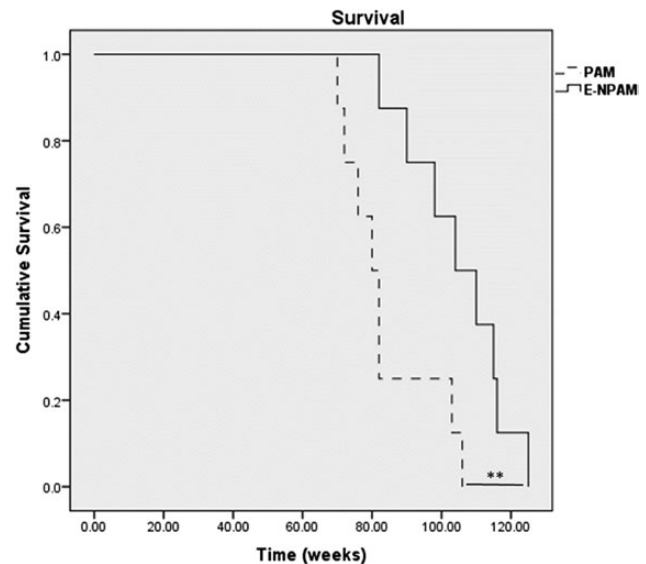


Figure 6. Kaplan-Meier cumulative survival of prematurely aging mice (PAM; dashed line) and exceptional nonprematurely aging mice (E-NPAM; solid line). Statistical differences between life spans were analyzed through Kaplan-Meier log-rank test. ^{**} $p < .01$.

has been hypothesized that antioxidants are an adaptive response to a pro-oxidant status (38). Thus, it seems paradoxical that long-lived individuals have high antioxidant mechanisms while showing a low pro-oxidant status. However, in the longitudinal study performed in mice, it was demonstrated that those mice that naturally reach a high longevity experienced an age-related increase in oxidant compounds when they are old. Thus, we believe that these individuals, unlike those that die at an average life span, can initiate compensatory mechanisms at this age. These involve a large increase in antioxidant defenses to deal with this age-related rise in oxidative stress, displaying a low pro-oxidant status and high antioxidant defenses when they are long-lived.

Studies regarding changes of redox parameters in blood of healthy aging populations are often conflicting (15,16). These disagreements are due to the different age cohorts and because of differences in the sample type studied such as plasma, serum, whole blood cells, or isolated erythrocytes. Thus, first we investigated if the observed changes in human whole blood reflect those experienced by isolated immune cells. The results regarding the age-related variations in MDA concentration demonstrate that these in whole blood reflect those experienced by neutrophils, but not those by lymphocytes. One possible reason is that phagocytes need to produce high $O_2^{\cdot-}$ concentrations to perform an effective phagocytic function (1,39), which may justify why they show a higher age-related increase in this peroxidative damage marker than lymphocytes. This agrees with results from previous studies, which show that phagocytes, both neutrophils in humans and macrophages in mice, are the type of immune cell that accumulate the most oxidative damage (39,40). This finding underscores the significance of choosing an appropriate sample type for investigating age-related changes in redox parameters. In the present work, whole blood was chosen to resemble the “in vivo” redox state. Moreover, whole blood samples are more reproducible, cost-effective, and easy to implement in the clinical setting than purified and isolated neutrophils and lymphocytes (40) and reflect the redox balance from other tissues such as liver, heart, and kidney (23,41). Moreover, peritoneal leukocytes from mice were chosen given that this sample allows for a longitudinal study to be performed, without the need for a high volume of blood

extracted from the animals, which ultimately will have an impact on their physiology. In addition, they have also been shown to mirror the redox status from other tissues (24).

Thus, it was demonstrated that older adult individuals and old mice have lower CAT, GPx, GR activities, and GSH concentrations as well as higher GSSG/GSH ratios, and GSSG, $O_2^{\bullet-}$, and MDA concentrations in blood and in peritoneal leukocytes, respectively, compared with adults. These results agree with other studies performed in human blood, in which lower CAT and GPx activities were reported in old participants in comparison to younger ones (42). Previous studies from our group have also demonstrated that leukocytes from old mice show lower CAT activity and GSH concentration compared with adult mice (39). Regarding oxidant compounds, these results are in consonance with other studies performed in humans in which higher MDA concentration was detected in plasma from older participants compared with younger individuals (43). Moreover, higher MDA and GSSG and lower GSH concentrations were found in erythrocytes (11) from older participants compared with younger ones. In the same manner, higher GSSG/GSH ratios, GSSG, $O_2^{\bullet-}$, and MDA have been detected in leukocytes from old mice compared with adult (39). Peroxidative damage to lipids, such as MDA, has been shown to experience an age-related increase in different cell types from several species (44). In fact, the increase in lipoxidation end products has been demonstrated to play a causal role in aging and in longevity (9,45).

Because the factors that underlie extreme longevity might help to achieve a prolonged healthy life span for all the population, in the present study, long-lived participants (both human and mice) showed similar enzyme antioxidant activities and GSH concentration as adults, or even higher. These results are in line with other studies in which higher CAT and GR activities have been reported in centenarians compared with adults (46,47) and with other studies, which have demonstrated that peritoneal leukocytes from naturally long-lived mice have higher or similar antioxidants than adults (48). Regarding oxidant compounds, long-lived participants showed similar concentrations to the ones observed in adults. Equivalent results have been obtained in other studies performed in mice (48) and in healthy centenarians where lower basal $O_2^{\bullet-}$ concentration and MDA plasma concentration have been detected compared with old participants (49).

Currently, conflicting evidence exists regarding the effects (positive, negative, or neutral) of ROS in aging. We believe that ROS have to be understood as second messengers in the stress response. In this sense, the main role of ROS production is the activation of compensatory homeostatic stress responses. As chronological age increases, damage and ROS levels also increase in an effort to maintain survival. If antioxidant mechanisms are not able to counteract this increase and ROS reach a certain threshold, their original homeostatic purpose is lost, and they eventually aggravate the age-associated damage (50). The results of the present study are in support of the free radical theory of aging. It was demonstrated that based on the redox status of whole blood cells, individuals from different age groups (adult, mature, and old) display a different redox signature, due to increased oxidant compounds. Individuals that surpass average life expectancy (nonagenarians) show a redox signature similar to adults, whereas centenarians display a unique signature due to their upregulation of antioxidant machinery. As a limitation of the study, we have to keep in mind that the study of these redox parameters has been performed only considering chronological age. However, given the heterogeneity of the aging rate within individuals, some adults display a redox signature proper to that in mature and old individuals and vice versa. Therefore, the inclusion of some measure of fitness or frailty status of the individuals in these type of studies would help elucidating the role of these redox markers in the rate of aging.

For the complete verification of the redox parameters as useful markers of the aging rate and predictors of life span, we have to consider the results obtained in PAM. It was found that PAM at the adult age had lower antioxidant defenses (CAT, GR, and GSH) as well as higher oxidant compounds (GSSG, MDA, and GSSG/GSH), in comparison with their E-NPAM counterparts of identical age. Moreover, they had a shorter life span, demonstrating that there could be a link between these parameters and mortality. It is not possible to confirm these facts in humans because of their very high longevity. Nevertheless, given the parallelism observed in the age-related changes in the redox parameters studied between both species (mice and humans), it could be extrapolated that those humans having these parameters with similar values to those of older individuals have a higher rate of aging and consequently will not live as long. We are aware that the samples studied in humans and mice (whole blood cells and peritoneal leukocytes, respectively) are in different environments; however, they both have been shown to reflect the redox state from other cells and tissues (22–24,41) and constitute the most accessible cell sample type in both cases allowing for a longitudinal follow-up to be performed. Given that the results presented here are descriptive, future work is needed for a better understanding of which redox parameters (if any) have a direct causative impact on longevity in humans.

We consider that knowing the rate of aging in humans is important for proposing lifestyle strategies (such as moderate physical activity and healthy nutrition) that could slow down the aging process, especially in those individuals with a high rate of aging. Moreover, due to the easy obtainability of the sample type used (whole blood) and the simplicity of the assays performed, these parameters can be quantified in any laboratory and therefore, they will be very helpful for detecting the rate of aging and the efficacy of lifestyle strategies that promote a healthy longevity.

Funding

This work was supported by grants of FIS (PI15/01787) from the Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union and of RETICEF (RD12/0043/0018) from the ISCIII-FEDER of the European Union and UCM-Research Group.

Conflict of Interest

None reported.

References

1. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11:298–300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
2. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1986;250:1058–1071. doi:10.1002/anie.198610581
3. Lapointe J, Hekimi S. Early mitochondrial dysfunction in long-lived *Melk1+/-* mice. *J Biol Chem.* 2008;283:26217–26227. doi:10.1074/jbc.M803287200
4. Yang W, Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000556. doi:10.1371/journal.pbio.1000556
5. Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol.* 2010;45:410–418. doi:10.1016/j.exger.2010.03.014
6. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2007;297:842–857. doi:10.1001/jama.297.8.842
7. Fisher D, Mentor S. Antioxidant-induced reductive stress has untoward consequences on the brain microvasculature. *Neural Regen Res.* 2017;12:743–744. doi:10.4103/1673-5374.206640

8. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:142–149. doi:10.1093/ajcn/87.1.142
9. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777:1249–1262. doi:10.1016/j.bbabo.2008.07.003
10. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, et al. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10469–10474. doi:10.1073/pnas.171202698
11. Gil L, Siems W, Mazurek B, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res.* 2006;40:495–505. doi:10.1080/10715760600592962
12. Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res.* 2006;40:1339–1349. doi:10.1080/10715760600953859
13. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
14. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6501046. doi:10.1155/2017/6501046
15. Stadtman ER. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:597–604. doi:10.1016/S0891-5849(02)00904-8
16. Winklhofer-Roob BM, Meinitzer A, Maritschnegg M, et al.; VITAGE Study Group. Effects of vitamin E depletion/repletion on biomarkers of oxidative stress in healthy aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1031:361–364. doi:10.1196/annals.1331.045
17. Martinez de Toda I, Vida C, De la Fuente M. An appropriate modulation of lymphoproliferative response and cytokine release as possible contributors to longevity. *Int J Mol Sci.* 2017;18:E1598. doi:10.3390/ijms18071598
18. Borkan GA, Norris AH. Assessment of biological age using a profile of physical parameters. *J Gerontol.* 1980;35:177–184. doi:10.1093/geronj/35.2.177
19. Anstey KJ, Lord SR, Smith GA. Measuring human functional age: a review of empirical findings. *Exp Aging Res.* 1996;22:245–266. doi:10.1080/03610739608254010
20. Mitnitski AB, Graham JE, Mogilner AJ, Rockwood K. Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age. *BMC Geriatr.* 2002;2:1. doi:10.1186/1471-2318-2-1
21. Burklee A, Moreno-Villanueva M, Bernhard J, et al. MARK-AGE biomarkers of ageing. *Mech Ageing Dev.* 2015;151:2–12. doi:10.1016/j.mad.2015.03.006
22. Martinez de Toda I, Maté I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging.* 2016;8:3110–3119. doi:10.18632/aging.101116
23. Margaritelis NV, Veskoukis AS, Paschalis V, et al. Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers.* 2015;20:97–108. doi:10.3109/1354750X.2014.1002807
24. Vida C, Rodríguez-Terés S, Heras V, Corpas I, De la Fuente M, González E. The aged-related increase in xanthine oxidase expression and activity in several tissues from mice is not shown in long-lived animals. *Biogerontology.* 2011;12:551–564. doi:10.1007/s10522-011-9351-6
25. Martínez de Toda I, Garrido A, Vida C, Gomez-Cabrera MC, Viña J, De la Fuente M. Frailty quantified by the “Valencia score” as a potential predictor of lifespan in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73:1323–1329. doi:10.1093/gerona/gly064
26. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14:157–162. doi:10.1159/000110640
27. Vida C, De la Fuente M. Stress-related behavioural responses, immunity and ageing in animal models. In: Bosch J, Phillips A, Lord J, eds. *Immunosenescence.* New York, NY: Springer. 2012:125–144. doi:10.1007/978-1-4614-4776-4_8
28. Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr Pharm Des.* 2014;20:4608–4628. doi:10.2174/1381612820666140130205822
29. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E. Ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res.* 2008;42:272–280. doi:10.1080/10715760801898838
30. Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952;195:133–140.
31. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;71:952–958. doi:10.1016/0006-291X(76)90747-6
32. Massey V, Williams CH Jr. On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem.* 1965;240:4470–4480.
33. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74:214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2
34. De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* 1985;81:935–938. doi:10.1016/0300-9629(85)90933-8
35. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological age predictors. *EBioMedicine.* 2017;21:29–36. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.046
36. Nakamura E, Miyao K. A method for identifying biomarkers of aging and constructing an index of biological age in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:1096–1105. doi:10.1093/gerona/62.10.1096
37. Calado RT, Dumitriu B. Telomere dynamics in mice and humans. *Semin Hematol.* 2013;50:165–174. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.03.030
38. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;6:183–197. doi:10.1016/j.redox.2015.07.008
39. Vida C, de Toda IM, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol.* 2017;12:423–437. doi:10.1016/j.redox.2017.03.005
40. Vida C, Martinez de Toda I, Garrido A, Carro E, Molina JA, De la Fuente M. Impairment of several immune functions and redox state in blood cells of Alzheimer's disease patients. relevant role of neutrophils in oxidative stress. *Front Immunol.* 2017;8:1974. doi:10.3389/fimmu.2017.01974
41. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kouretas D. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1371–1374. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.014
42. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 1991;37:1932–1937.
43. Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, et al. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2004;25:5–16. doi:10.1016/j.mam.2004.02.003
44. Naudí A, Jové M, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G, Pamplona R. Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Front Physiol.* 2013;4:372. doi:10.3389/fphys.2013.00372
45. Jové M, Naudí A, Gambini J, et al. A stress-resistant lipidomic signature confers extreme longevity to humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72:30–37. doi:10.1093/gerona/glw048
46. Kłapcińska B, Derejczyk J, Wiczerowska-Tobis K, Sobczak A, Sadowska-Krepa E, Danch A. Antioxidant defense in centenarians (a preliminary study). *Acta Biochim Pol.* 2000;47:281–292.
47. Andersen HR, Jeune B, Nybo H, Nielsen JB, Andersen-Ranberg K, Grandjean P. Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians. *Age Ageing.* 1998;27:643–648.
48. Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor kappa B. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010;65:941–950. doi:10.1093/gerona/gly101
49. Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, et al. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol.* 2003;38:137–143. doi:10.1016/S0531-5565(02)00153-5
50. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 2011;21:569–576. doi:10.1016/j.tcb.2011.06.008

CAPÍTULO DOS: Identificación de mecanismos celulares y moleculares implicados en la velocidad de envejecimiento y longevidad, mediante su estudio en ratones de distintas edades incluyendo aquellos que de forma natural alcanzan una elevada longevidad y ratones con envejecimiento prematuro.



Article

An Appropriate Modulation of Lymphoproliferative Response and Cytokine Release as Possible Contributors to Longevity

Irene Martínez de Toda ^{1,2}, Carmen Vida ^{1,2} and Mónica De la Fuente ^{1,2,*}

¹ Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid 28040, Spain; irene_mc90@hotmail.com (I.M.d.T.); carmenvidarueda@hotmail.com (C.V.)

² Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid 28041, Spain

* Correspondence: mondelaf@bio.ucm.es; Tel.: +34-91-394-4989

Received: 26 June 2017; Accepted: 19 July 2017; Published: 24 July 2017

Abstract: The decrease in the proliferative response of lymphocytes is one of the most evident among the age-related changes of the immune system. This has been linked to a higher risk of mortality in both humans and experimental animals. However, long-lived individuals, in spite of optimally maintaining most of the functions of the immune system, also seem to show an impaired proliferative response. Thus, it was hypothesized that these individuals may have distinct evolution times in this proliferation and a different modulatory capacity through their cytokine release profiles. An individualized longitudinal study was performed on female ICR-CD1 mice, starting at the adult age (40 weeks old), analyzing the proliferation of peritoneal leukocytes at different ages in both basal conditions and in the presence of the mitogen Concanavalin A, for 4, 24 and 48 h of culture. The cytokine secretions (IL-2, IL-17, IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10) in the same cultures were also studied. Long-lived mice show a high proliferative capacity after short incubation times and, despite experiencing a functional decline when they are old, are able to compensate this decrease with an appropriate modulation of the lymphoproliferative response and cytokine release. This could explain their elevated resistance to infections and high longevity.

Keywords: proliferation; cytokine; aging; longevity; leukocytes

1. Introduction

It is known that the aging process is accompanied by a deterioration of the competence of the immune system. Thus, with aging there is an increased susceptibility to infectious diseases, autoimmune and cancer processes, which exerts a great influence on age-related morbidity and mortality [1,2]. Aging of the immune system, which is known as immunosenescence, involves a striking rearrangement of almost every component, leading to changes including enhanced as well as diminished functions [3,4]. In addition, the functioning of the immune system has been demonstrated to be an excellent marker of health, given that several age-related changes in immune functions are predictive of mortality and lifespan [3,5–9]. Thus, long-lived individuals seem to exhibit a high degree of preservation of several functions of the immune system with values similar to those observed in adult individuals. This may be essential to reach a very advanced age in a healthy condition [3,10–14].

Among all the age-related changes that the immune system undergoes, the most obvious is the involution of the thymus gland [15,16]. Accordingly, one of the most marked age-related alterations in the immune cells has been reported in the T lymphocytes, specifically in the lymphoproliferative response to mitogens, which is decreased in old subjects for both humans and experimental animals [13,14,17–19]. The study of the proliferative response of leukocytes to a given stimulus has become an important issue given that a low lymphoproliferative response to mitogens has been linked

to an increased mortality, and together with other parameters, defines the immune risk phenotype in humans [20,21]. Moreover, this low lymphoproliferative response reported in human peripheral blood cells has also been found in peritoneal, spleen, lymphoid nodes and thymus leukocytes from rodents, and it is related to a higher morbidity and mortality in aged animals [3,9,14]. However, there are conflicting results regarding this function in long-lived individuals, given that most of the studies describe a similar response to that of older people [22,23].

Cytokines are principal mediators of interactions among immune cells. They are responsible for the development and resolution of immune response and are greatly affected by the aging process [3,7,24–26]. In fact, an age-related loss of homeostasis in cytokine networks can contribute significantly to health impairment in old age [26]. In this context, together with the previously mentioned age-related loss of functionality in immune cells, aging is characterized by a chronic low-grade inflammatory status, so-called “inflamm-aging” [7,25]. Thus, it has been described that an age-related increase in release of pro-inflammatory cytokines in resting cells leads to a sterile inflammation [4]. This is accompanied by an elevation of circulating levels of cytokines in old subjects, such as IL-6, which in addition has been related to a higher risk of mortality [7,27–29]. However, cells from old subjects produce lower pro-inflammatory cytokines when needed to do so, i.e., after a mitogenic stimulus, compared to those of adult subjects [24,30,31]. Again, long-lived individuals, despite having high levels of pro-inflammatory markers, have a postponed disease onset, making it difficult to understand whether “inflamm-aging” is beneficial or detrimental [32].

Based on the striking facts regarding lymphoproliferation and cytokine release by immune cells in long-lived individuals, it was hypothesized that these individuals could present different proliferative as well as cytokine release dynamics as an adaptive mechanism [10,33]. Moreover, given that all the studies in long-lived individuals previously mentioned have been cross-sectional, it is still not known if they reach those advanced ages due to the maintenance of optimal immune cell function during their whole life (as if they were adults) or whether they experience an age-related impairment in these functions but are able to compensate for it.

In order to address these questions, an individualized longitudinal study was performed on female ICR-CD1 mice analyzing the proliferation as well as the cytokine secretion profile of leukocytes obtained from peritoneum of animals at different ages. The study was performed starting at the adult age, 40 weeks old, and followed each animal individually until its death. The proliferative capacity as well as the cytokine release profile was studied in both un-stimulated/basal conditions and after incubation with a T-cell mitogenic stimulus (Concanavalin A) for 4, 24 and 48 h.

2. Results

The results of the lymphoproliferation after incubation with the T-cell mitogenic stimulus Concanavalin A (Con A), expressed as the percentage of stimulation, are shown in Figure 1. There was a decreased proliferation in mature mice (56 weeks of age) compared to when they were adults (40 weeks of age) after 4 h ($p < 0.05$) and 48 h of incubation ($p < 0.001$). At old age (72 weeks of age), they also had decreased proliferation compared to when they were adults after 4, 24 ($p < 0.05$) and 48 h of incubation ($p < 0.001$). The decrease in this proliferation in cells of very old mice (96 weeks of age) with respect to when they were adults, was only observed at 48 h of incubation ($p < 0.05$). However, when mice reached high longevity (120 weeks of age) they showed an increased proliferation with respect to when they were mature, old and very old at 4 and 24 h ($p < 0.001$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). With respect to when they were adults, the percentage of proliferation only increased at 24 h ($p < 0.05$) whereas at 48 h they showed a decrease ($p < 0.05$). The green points represent the values of mice that reached 120 weeks of age, and it can be observed that the three long-lived mice always show values above the mean.

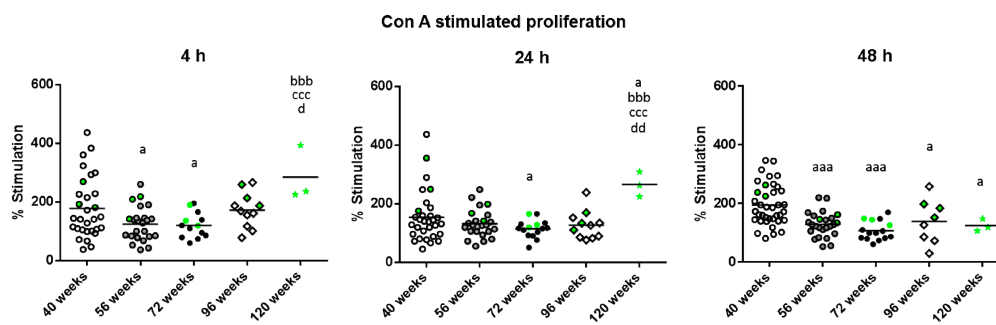


Figure 1. Stimulation of proliferation, expressed as percentages, in response to Con A (1 $\mu\text{g/mL}$), of peritoneal leukocytes from adult (40 weeks), mature (56 weeks), old (72 weeks), very old (96 weeks) and long-lived (120 weeks) mice after 4, 24 and 48 h of culture. The green points represent the values in mice that reached 120 weeks. a: $p < 0.05$; aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult mice. bbb: $p < 0.001$ with respect to the value in mature mice. ccc: $p < 0.001$ with respect to the value in old mice. d: $p < 0.05$; dd: $p < 0.01$ with respect to the value in very old mice.

Regarding the levels of IL-2 released in the cultures in presence of Con A (Figure 2), striking differences depending on the incubation time were found. Thus, after 4 h, increased levels were observed in the long-lived mice with respect to when they were adult and old ($p < 0.001$). However, after 24 h of incubation, long-lived mice as well as old mice showed decreased levels compared to when they were adult ($p < 0.05$) and after 48 h of incubation, long-lived mice showed decreased levels compared to when they were adult ($p < 0.05$). It can be observed that in general, the three long-lived mice (highlighted in green) show values above the mean of the group.

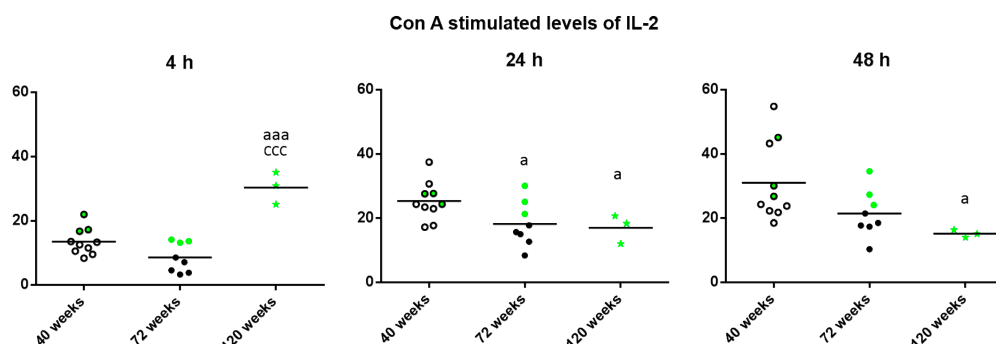


Figure 2. Levels (pg/mL) of IL-2 releases by peritoneal leukocytes from adult (40 weeks), old (72 weeks) and long-lived (120 weeks) mice, after 4, 24 and 48 h of culture in presence of Con A (1 $\mu\text{g/mL}$). The green points represent the values in mice that reached 120 weeks. a: $p < 0.05$; aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult mice. ccc: $p < 0.001$ with respect to the value in old mice.

With respect to the levels of cytokine released in the cultures in presence of Con A (Figure 3), the levels of IL-1 β (Figure 3A) decreased at old age in comparison to those when the animals were adult ($p < 0.001$ after 4 h, $p < 0.05$ after 24 h, $p < 0.01$ after 48 h of culture). However, mice reaching high longevity showed an increase in the levels of this cytokine with respect to when they were old ($p < 0.01$ at 4 h and $p < 0.001$ at 24 and 48 h of culture) and similar to when they were adults at 4 h of culture or even higher ($p < 0.001$) at 24 and 48 h. Regarding the levels of IL-6 (Figure 3B), again at old age they decreased in comparison to those when the animals were adults ($p < 0.05$ after 4 and 48 h; $p < 0.001$ after 24 h of culture), whereas when mice reached high longevity these levels increased with respect to when they were old ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ after 4, 24 and 48 h, respectively), being similar to the levels obtained when they were adults (at 4 and 24 h) or higher ($p < 0.01$ at 48 h). The

results obtained with IL-17 (Figure 3C), show that old mice presented decreased levels with respect to when they were adult after 24 and 48 h of incubation ($p < 0.001$), whereas long-lived mice showed increased levels with respect to when they were old ($p < 0.001$) independently of the incubation time. Thus, long-lived mice showed similar levels to when they were adults.

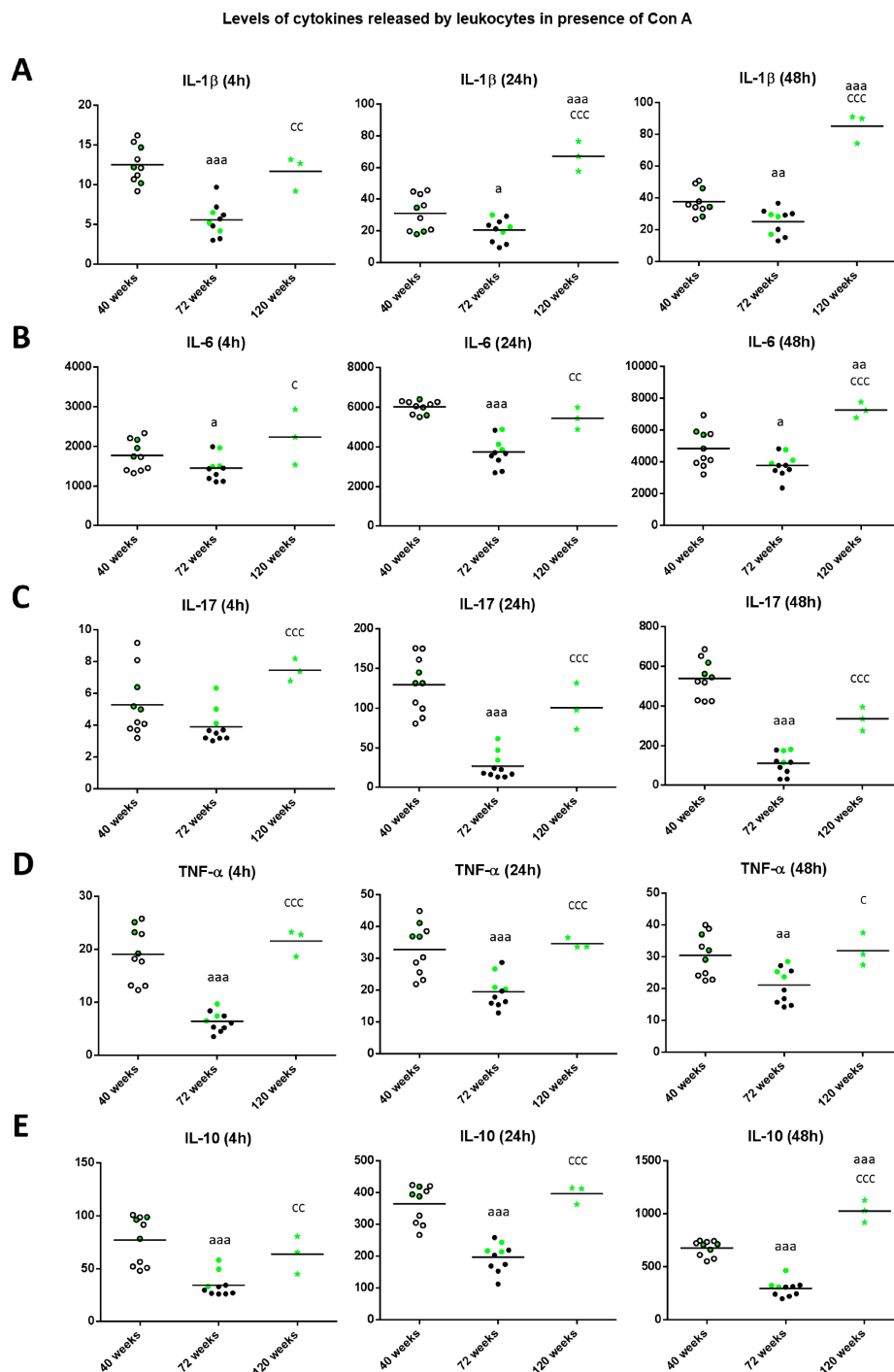


Figure 3. Levels (pg/mL) of IL-1 β (A); IL-6 (B); IL-17 (C); TNF- α (D) and IL-10 (E) released by peritoneal leukocytes of adult (40 weeks), old (72 weeks) and long-lived (120 weeks) mice, after 4, 24 and 48 h of culture in presence of Con A (1 μ g/mL). The green points represent the values in mice that reached 120 weeks. a: $p < 0.05$; aa: $p < 0.01$; aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult mice. c: $p < 0.05$; cc: $p < 0.01$; ccc: $p < 0.001$ with respect to the value in old mice.

With respect to the levels of TNF- α (Figure 3D), old mice showed decreases compared to when they were adult ($p < 0.001$ at 4 and 24 h, $p < 0.01$ at 48 h of culture), whereas long-lived mice showed increased levels with respect to when they were old ($p < 0.001$ after 4 and 24 h, and $p < 0.05$ after 48 h) and similar to when they were adults. Regarding the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 3E), old mice showed decreased values in comparison to those when they were adults ($p < 0.001$ independently of the incubation time). However, long-lived mice showed increased levels with respect to when they were old ($p < 0.01$ after 4 h, $p < 0.001$ after 24 and 48 h) and similar to when they were adults (at 4 and 24 h of culture) and even increased ($p < 0.001$) to when they were adults after 48 h of culture. It can be observed that in general, the three long-lived mice (highlighted in green) always show values in all these cytokines above the mean when they were adult and old animals.

With respect to basal proliferation (Figure 4), which is what takes place in the absence of a proliferative stimulus, there was a significant increase in the old mice with respect to when they were adult and mature ($p < 0.001$) independently of the incubation time. Furthermore, there was a decrease in very old mice compared to when they were old after 24 and 48 h of incubation ($p < 0.05$). This decrease was also found in long-lived compared to old mice at 4 and 48 h ($p < 0.001$) and to very old mice at 4 h ($p < 0.05$). However, very old and long-lived mice showed similar levels to when they were adults and mature. It can be observed that the three long-lived mice always show values below the mean for basal proliferation.

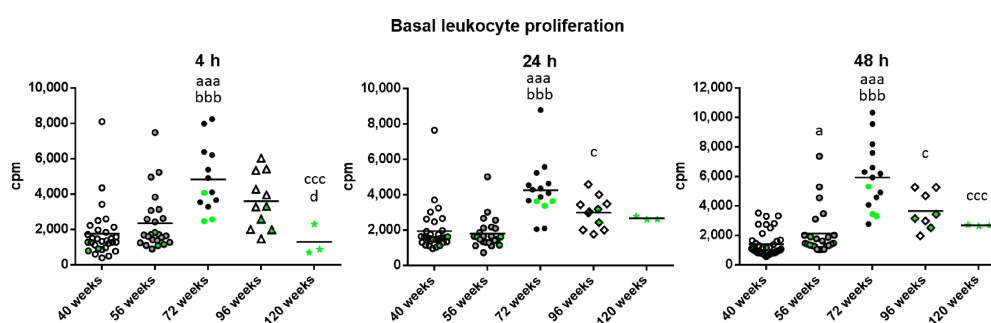


Figure 4. Basal proliferation (cpm) of peritoneal leukocytes from adult (40 weeks), mature (56 weeks), old (72 weeks), very old (96 weeks) and long-lived (120 weeks) mice, after 4, 24 and 48 h of culture. The green points represent the values in mice that reached 120 weeks. a: $p < 0.05$; aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult mice. bbb: $p < 0.001$ with respect to the value in mature mice. c: $p < 0.05$; ccc: $p < 0.001$ with respect to the value in old mice. d: $p < 0.05$ with respect to the value in very old mice.

Regarding the levels of IL-1 β released in basal conditions (Figure 5A), old mice showed increased levels compared to when they were adults after 24 h of incubation ($p < 0.01$). Moreover, there was a significant increase in long-lived mice with respect to when they were adult independently of the incubation time ($p < 0.001$) and with respect to when they were old ($p < 0.05$ after 24 h, $p < 0.001$ after 4 and 48 h). The levels of IL-6 in basal conditions (Figure 5B), in both old and long-lived mice showed increased levels compared to when they were adults ($p < 0.001$ independently of the incubation time). Moreover, there was a significant increase in long-lived mice with respect to when they were old ($p < 0.01$ after 24 h, $p < 0.001$ after 48 h of culture).

Regarding the levels of TNF- α in basal conditions (Figure 5C), old and long-lived mice showed increased levels ($p < 0.001$) compared to when they were adults after 4 h of incubation. In addition, after 24 and 48 h of incubation, old mice showed increased levels compared to when they were adults ($p < 0.001$), whereas long-lived mice showed decreased levels ($p < 0.001$) with respect to those when they were old and similar to when they were adults.

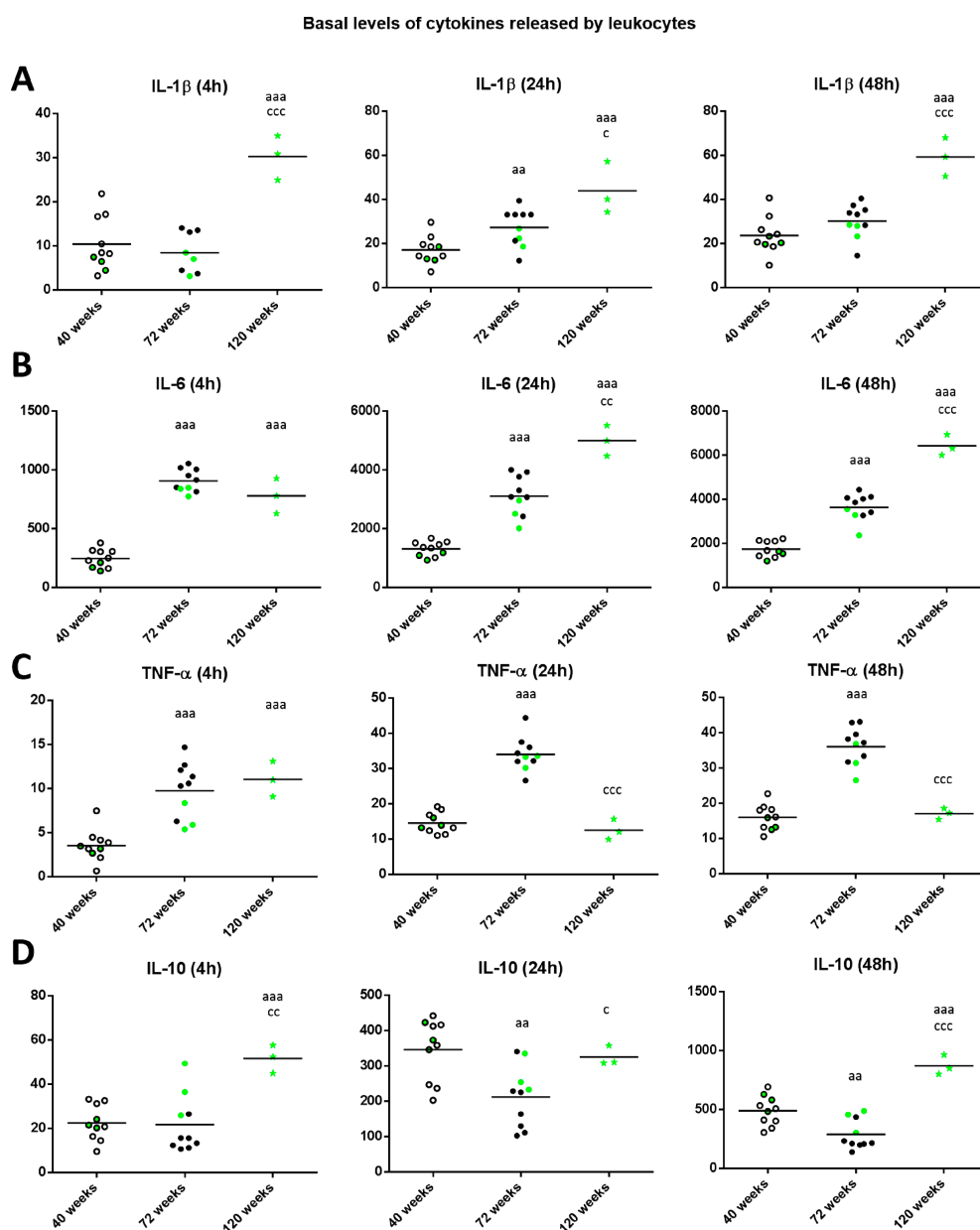


Figure 5. Levels (pg/mL) of IL-1 β (A); IL-6 (B); IL-17 (C); TNF- α (D) and IL-10 (E) released by peritoneal leukocytes from adult (40 weeks), old (72 weeks) and long-lived (120 weeks) mice after 4, 24 and 48 h of culture. The green points represent the values in mice that reached 120 weeks. aa: $p < 0.01$; aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult mice. c: $p < 0.05$; cc: $p < 0.01$; ccc: $p < 0.001$ with respect to the value in old mice.

With respect to IL-10 levels in basal conditions (Figure 5D), old mice showed decreased levels compared to when they were adults ($p < 0.01$ after 24 and 48 h of culture). Moreover, in long-lived mice the levels were similar (24 h of culture) or increased ($p < 0.001$ after 4 and 48 h of incubation) with respect to those when they were adults, and with respect to when they were old ($p < 0.01$ after 4 h, $p < 0.05$ after 24 h and $p < 0.001$ after 48 h). It can be observed that in general, the three long-lived mice (highlighted in green) always show values below the mean for the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 γ TNF- α when they were adult and old, whereas show values above the mean for the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Finally, given that the maintenance of health relies on the adequate balance of antiinflammatory and proinflammatory mediators, the IL-10/TNF- α ratio was calculated in unstimulated conditions to shed light on the age-related changes of this balance. As shown in Figure 6, old mice have a decreased IL-10/TNF- α ratio compared to when they were adults ($p < 0.05$ after 4 h, $p < 0.001$ after 24 and 48 h of culture). However, long-lived mice show the opposite results, with an increased IL-10/TNF- α ratio compared to when they were old ($p < 0.001$ after 24 and 48 h).

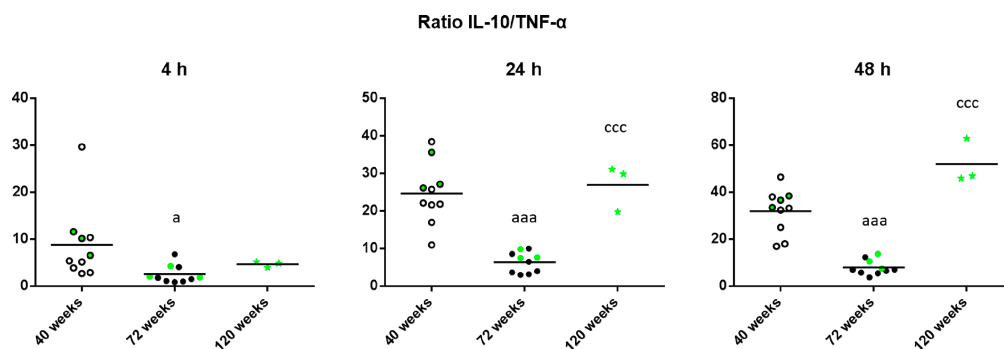


Figure 6. IL-10/TNF- α ratios of the levels of these cytokines released by peritoneal leukocytes from adult (40 weeks), old (72 weeks) and long-lived (120 weeks) mice after 4, 24 and 48 h of culture. The green points represent the values in mice that reached 120 weeks. a: $p < 0.05$; aaa: $p < 0.001$ with respect to the value in adult mice. ccc: $p < 0.001$ with respect to the value in old mice.

3. Discussion

This is the first study which analyzes the age-related changes in lymphoproliferation as well as in cytokine release under resting and stimulated conditions at different incubation times in a longitudinal study, monitoring individually each animal throughout their lifetime.

Lymphocytes are important regulator and effector cells in adaptive immunity, and their activation and proliferation is essential for an appropriate immune response and, consequently, to the maintenance of homeostasis. The age-related decrease in Con A-induced proliferation shown in the present work, which mimics the stimulation by antigens [34], is in agreement with the results obtained from many previous studies carried out in 48 h cultures [13,14,17,19,35–37]. However, this is the first work showing that at 4 and 24 h of culture, lymphocytes from old mice also present a decrease in their percentage of proliferative stimulation.

It has been suggested that oxidative stress impairs the ability of lymphocytes to respond to a stimulus such as mitogenic or antigenic stimuli [38–40], so the age-related increase in oxidative stress that is known to occur in immune cells [41,42], could be the underlying mechanism for the age-related decrease in Con A-induced proliferation. Another possible explanation could be that given that immune cells replicate multiple times due to chronic stimulation or encountering many pathogens during a lifetime, they lose their proliferation capacity and may reach the stage of replicative senescence [43,44]. However, cells of mice achieving high longevity maintain this capacity but with different dynamics. Thus, there was a stronger proliferative response in these animals after 4 and 24 h of incubation with Con A than when they were younger. Furthermore, after 48 h of incubation these differences were no longer noticeable. Since the results are shown individually, it is possible to observe that those mice that achieved a high longevity, and presented proliferative values above the mean of the age group throughout their lives. Moreover, the strong increase of proliferation at 4 and 24 h in these animals could suggest a faster capacity of the immune response against antigens, which may represent an immune advantage. A possible explanation for the fact that long-lived mice show less proliferation after 48 h of incubation than after 4 and 24 h could be due to an increase in the activation-induced cell death (AICD) after 24 h. AICD plays a key role in the maintenance of immune

system homeostasis and it is of physiological importance, as the presence of too many activated cells might trigger excessive secondary immune responses leading to symptoms similar to autoimmune disorders and toxic shock [45–48]. Another explanation for the increased lymphoproliferative response at 4 h in long-lived mice could be the higher release of IL-2, which occurs at that time. In fact, IL-2 is of great importance for proliferative T-cell response [49] and it is well-established that aging is related to an impaired release of IL-2 by in vitro stimulated T cells in rodents and humans [13,49]. In the present study, the lower IL-2 levels at 24 and 48 h of culture found in old mice in comparison to their adult values are in agreement with all previous studies.

It is known that immune cells communicate with each other through cytokines, which are soluble mediators that, through a complex network of interactions, are crucial for the functioning of the immune system and its fine-tuning. With aging, the production, release and action of these cytokines suffer impairments [3,7,24–26]. In this context, most of the studies of immunosenescence have focused on isolated subsets of immune cell types [26] and on the levels of cytokines after 48 h of culture [24]. The data described here are thus of special relevance, since this study was performed using unfractionated peritoneal leukocytes in order to reproduce more accurately the in vivo cytokine response. Furthermore, the age-related changes in cytokine release were analyzed after different incubation times. Thus, in presence of Con A, old mice show a decreased secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and IL-17) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) compared to when they were adults, in agreement with previous results obtained in cross-sectional studies on mice [24]. The release of such cytokines is of great importance for the triggering of the immune response. Thus, IL-1 β is an important mediator in infection that stimulates intrinsic, innate and adaptive immune pathways [50] as well as IL-6, which contributes to host defense through the stimulation of acute phase responses, hematopoiesis and immune reactions [51]. In addition, IL-17 has been recently described as an important orchestrator of immunity [52]. Thus, the reduced release of these cytokines in stimulated leukocytes from old mice could be the cause of the impaired immune responses found in both aged humans and rodents [3,13,14,20,21,53]. In mice that achieve a high longevity, the values of these cytokines, which were above the media of the age group throughout their lives, were, in many cases, similar to those when they were adults. These results agree with those obtained in cross-sectional studies previously carried out [24]. The data obtained in these cross-sectional studies could make one think that those animals that reach high longevity, maintain an immune function similar to adults during their lifetime. However, the results of the present study demonstrate that animals which reach high longevity experience an age-related decrease of cytokine release capacity in response to a stimulus when they are old, but they possess better compensatory mechanisms which allow for its recovery when they are long-lived. A possible explanation for the fact that long-lived mice show even higher levels of pro-inflammatory cytokines in some cases compared to when they were adults or old will be discussed later in this article.

Regarding what is known about the age-related changes in the lymphoproliferative response, most of the research performed has been focused on the ability of lymphocytes to proliferate towards a stimulus, whereas there are almost no studies that have investigated the proliferative ability of lymphocytes in unstimulated/basal conditions. However, the study of lymphoproliferation in basal conditions could be a useful age-related marker, given that it provides information on how much inner damage the immune system is trying to fight. It is known that damage-associated molecular patterns (DAMPs) increase with the advance of age due to the larger number of tissue injuries in the body and that these molecules are able to trigger an activation of the immune system response by initiating the release of pro-inflammatory cytokines [54,55]. In the present study, it has been found that old mice exhibit a significant increase in the basal proliferation with respect to when they were younger, whereas long-lived mice show basal proliferative levels similar to when they were adults. The high proliferation in the absence of stimulus seen in old mice implies a deregulation of the immune system. This suggests that peritoneal leukocytes from old mice are overactivated, possibly due to DAMPs, which, through the release of cytokines, could be responsible for the establishment of “sterile

inflammation" in the elderly [3,54]. In addition, it has been suggested that oxidative-inflammatory stress can activate signaling pathways that lead to proliferation, which would also explain this proliferation of lymphocytes without antigen stimulation [40,56,57]. In fact, in the present study, old mice showed a higher basal release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α , compared to when they were adults. This higher basal release could be responsible for the establishment of the chronic low-grade inflammation that is known to occur in old individuals. Notably, long-lived mice showed even higher basal release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and IL-6, compared to when they were old. This fact is striking given that high levels of IL-6 and IL-1 β have been referred to as the most powerful predictors of morbidity and mortality in the elderly [28,29] and naturally long-lived mice would be expected to have withstood the detrimental effects of the aging process better than those individuals who do not live to extreme old age. Thus, these high levels of pro-inflammatory cytokines could be the consequence of the successful adaptation to a number of stresses, including infections, which unceasingly occur throughout life, as other authors have proposed [4,58]. Even though low-grade chronic inflammation is a characteristic of aged people and centenarians, it has been suggested that the difference between them is that the long-lived are able to avoid the main age-related diseases and reach exceptional ages due to the contrasting action of anti-inflammatory agents [59,60]. In the present study, it was shown that leukocytes from long-lived mice release high levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in unstimulated conditions, even higher than when they were adult, which could be the underlying mechanism for the maintenance of health in longevity, as it has also been found in long-lived rats [61]. In addition, the high release of IL-10 in leukocytes of long-lived mice after 4 h of culture can explain the decrease in TNF- α levels found in these animals at 24 and 48 h of incubation, since IL-10 inhibits the release of TNF- α [62,63]. Moreover, the present study demonstrated that the balance between anti-inflammatory and pro-inflammatory mediators (IL-10/TNF- α ratio), could be a useful parameter, given that its values are similar in adult and long-lived mice, whereas old mice show a decreased ratio. In fact, a recent study pointed at the anti-inflammatory/inflammatory ratio as an indicator of successful aging and longevity [61].

Altogether, it seems that the chronic basal pro-inflammatory state shown by non-stimulated leukocytes from old animals in the present work is linked to a defective inflammatory response upon stimulation that will ultimately limit the ability of these animals to deal with infections [54]. In fact, 85-year-old humans who produce low ex vivo levels of Lipopolysaccharide-induced pro- and/or anti-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α and IL-10, have more than a twofold higher mortality risk compared to their age-matched counterparts with a higher cytokine production [64]. Conversely, extremely long-lived mice in general showed a similar cytokine profile upon Con A stimulation to the one when they were adults, demonstrating that immune cells from long-lived individuals have achieved the capacity to trigger an adequate immune response. It is crucial to bear in mind that the study of the age-related changes of both lymphoproliferation as well as cytokine release at only one point in time may not be optimal [65]. The results of the present study are in agreement with this idea due to the finding that long-lived mice have an earlier response both in lymphoproliferation as well as in cytokine release compared to when they were old.

Another significant contribution of the study is the determination of the age-related changes regarding lymphoproliferative and cytokine release ability, which a long-lived individual experiences throughout its lifetime, from its adulthood until its death. Thus, the present study reveals that those mice that naturally achieve high longevity are the ones that not only maintained lower levels of basal proliferation and higher levels of proliferation after Con A stimulation during their whole lifetime, but are also those that achieve a better control of the effects of aging on the immune functions. Thus, long-lived mice are those that maintained a lower secretion of pro-inflammatory cytokines and a higher secretion of anti-inflammatory cytokines in unstimulated conditions as well as a higher one upon Con A-stimulation when they were old, compared to their age-matched counterparts. Moreover, this is the first study to demonstrate that the animals reaching high longevity experience immune-senescent changes (to a lesser extent than those which do not reach advanced ages), but they are able to

compensate for them by showing optimal levels when they are long-lived. According to a perspective recently suggested [66], the best candidates to become long-lived are not the strongest and most robust subjects among their age cohort, but subjects that better adapt to the environment, showing more biological plasticity. Thus, we observed in the present study that if the effects of age are suffered by all individuals, those that exhibited better capacity of control of the situation by improving the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and restraining the release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , achieved higher longevity. Furthermore, the study suggests that the IL-10/TNF- α ratio in unstimulated conditions is a better indicator of mouse longevity than any of the inflammatory mediators solely. More studies are needed to corroborate if this good control capacity in long-lived individuals could be shown in other immune cell responses.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Female ICR/CD1 ex-reproductive mice (*Mus musculus*) were used in this study. Animals were purchased from Janvier Labs (Aachen, Germany) at the adult age (32 ± 4 weeks), and were placed and acclimatized in the Animal Facility at the Faculty of Biology of Complutense, University of Madrid (UCM) (Spain). Mice were housed at 4–5 per cage and maintained in standard laboratory animal conditions for pathogens, temperature (22 ± 2 °C) and humidity (50–60%), on a 12/12 h reversed light/dark cycle (lights on at 20:00 h) to avoid circadian interferences. Mice had access to tap water and standard pellets (Panlab, Barcelona, Spain) ad libitum. One group of animals ($n = 40$) was used for the longitudinal study. The collection of peritoneal suspensions was at the adult (40 ± 4 weeks; $n = 38$), mature (56 ± 4 weeks; $n = 25$), old (72 ± 4 weeks; $n = 15$), very old (96 ± 4 weeks; $n = 8$) and long-lived (120 ± 4 weeks; $n = 3$) ages. All the animals had a natural death and whereas no weight loss (<20%), moribund state or tumor formation were detected, the cause of death was not investigated further. All the experiments were approved by the Experimental Animal Committee of Complutense, University of Madrid (UCM) (Spain) and were in accordance to the guidelines of the European Community Council Directives 2010/63/EU of 22 September 2010.

4.2. Collection of Peritoneal Leukocytes

Peritoneal suspensions containing unfractionated leukocytes, were collected from each mouse between 08:00 and 10:00 h to minimize circadian variations of the immune parameters studied without killing the animals, which allowed a longitudinal study to be performed. Without using anesthesia, mice were held by cervical skin and 3 mL of sterile Hank's solution at 37 °C was injected into the peritoneum. After massaging the abdomen of the mouse, approximately 80% of the injected volume, containing the peritoneal leukocytes, was recovered using the needle employed for the Hank's injection. Leukocytes from peritoneal cell suspensions were quantified in Neubauer chambers using optical microscopy (40 \times). Cell viability was checked by the Trypan Blue exclusion test and only cell suspensions with cell viability of 99% or higher were used.

4.3. Lymphoproliferation

The proliferation capacity of lymphocytes was evaluated by the method previously described [67]. Peritoneal cell suspensions were adjusted to 5×10^5 lymphocytes/mL in complete medium containing RPMI-1640, 10% fetal bovine serum and 1% gentamicin. 200 μ L containing 1×10^5 lymphocytes were dispensed into 96-well plates. 20 μ L/well of complete medium or Con A (1 μ g/mL), a T cell mitogen lectin, were added, for basal and stimulated conditions, respectively. The plates were incubated at 37 °C in a sterile and humidified atmosphere of 5% CO₂ for 4, 24 and 48 h. After these time points, 100 μ L of culture supernatants were collected for cytokine measurements and afterwards, 2.5 μ Ci ³H-thymidine (Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany) together with 100 μ L of fresh medium were added to each well, followed by another incubation of 24 h. Cells were harvested in a semiautomatic harvester

(Skatron Instruments, Tranby, Norway) and thymidine uptake was measured in a β counter (LKB, Upsala, Sweden) for 1 min. The results were calculated as ^3H -thymidine uptake (counts per minute, cpm) for basal and stimulated conditions, and basal proliferation was expressed as cpm whereas stimulated proliferation was expressed as the percentage of lymphoproliferation capacity (%) giving the value 100 to the cpm in basal conditions.

4.4. Cytokine Measurement

In order to study the levels of cytokines in the environment surrounding immune cells influencing the lymphoproliferative responses, supernatant samples were collected after each incubation time (4, 24 and 48 h) in the absence or presence of Con A. For this, the samples were obtained from the same culture well-plates used for determining proliferation prior to the addition of ^3H -thymidine. In aliquots of 100 μL of culture supernatants, the levels of cytokines, including growth factors (IL-2), proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-17) as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10, were measured simultaneously by multiplex luminometry (Beadlyte mouse multiplex cytokine detection system, MHSTCMAG-70K, Millipore, Billerica, MA, USA). The measurements were carried out in samples of adult, old and long-lived mice.

4.5. Statistical Analysis

SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis of the results. All data are expressed as the mean of the values corresponding to subjects, each value being the mean of duplicate assays. The normality of the samples and the homogeneity of variances were checked by the Kolmogorov–Smirnov and Levene analyses, respectively. Differences due to age were studied through Student's *t*-test for independent samples. Two-sided $p < 0.05$ was considered the minimum level of significance.

Acknowledgments: This work was supported by the grants of the Research group of UCM (910379) and FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union.

Author Contributions: Mónica De la Fuente formulated the original problem and provided direction and guidance. Irene Martínez de Toda performed the experiments together with Carmen Vida. Irene Martínez de Toda drafted the manuscript and Mónica De la Fuente performed a critical revision of the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

AICD	Activation-induced cell death
Con A	Concanavalin A
DAMPs	Damage associated molecular patterns
LPS	Lipopolysaccharide

References

1. Fulop, T.; Larbi, A.; Kotb, R.; de Angelis, F.; Pawelec, G. Aging, immunity, and cancer. *Discov. Med.* **2011**, *11*, 537–550. [[PubMed](#)]
2. Dewan, S.K.; Zheng, S.B.; Xia, S.J.; Bill, K. Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly to infections. *Chin. Med. J.* **2012**, *125*, 3325–3331. [[PubMed](#)]
3. De la Fuente, M.; Miquel, J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 3003–3026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bauer, M.E.; De la Fuente, M. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech. Ageing Dev.* **2016**, *158*, 27–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wayne, S.J.; Rhyne, R.L.; Garry, P.J.; Goodwin, J.S. Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J. Gerontol.* **1990**, *114*, 80–88. [[CrossRef](#)]

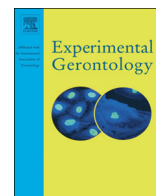
6. Ferguson, F.G.; Wikby, A.; Maxson, P.; Olsson, J.; Johansson, B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: A comparison between survivors and nonsurvivors. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **1995**, *50*, B378–B382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. De Martinis, M.; Franceschi, C.; Monti, D.; Ginaldi, L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp. Mol. Pathol.* **2006**, *80*, 219–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Guayerbas, N.; Puerto, M.; Víctor, V.M.; Miquel, J.; De la Fuente, M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp. Gerontol.* **2002**, *37*, 249–256. [[CrossRef](#)]
9. Guayerbas, N.; De la Fuente, M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev. Comp. Immunol.* **2003**, *27*, 339–350. [[CrossRef](#)]
10. Franceschi, C.; Monti, D.; Sansoni, P.; Cossarizza, A. The immunology of exceptional individuals: The lesson of centenarians. *Immunol. Today* **1995**, *16*, 12–16. [[CrossRef](#)]
11. Puerto, M.; Guayerbas, G.; Álvarez, P.; De la Fuente, M. Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J. Neuroimmunol.* **2005**, *165*, 33–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Alonso-Fernández, P.; Puerto, M.; Maté, I.; Ribera, J.M.; De la Fuente, M. The neutrophils of centenarians show function levels similar to those of adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2008**, *56*, 2244–2251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Arranz, L.; Caamaño, J.; Lord, J.M.; De la Fuente, M. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: Possible role of nuclear factor- κ B. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2010**, *65*, 941–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. De Toda, I.M.; Maté, I.; Vida, C.; Cruces, J.; De la Fuente, M. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging* **2016**, *8*, 3110–3119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Aspinall, R.; Andrew, D. Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.* **2000**, *20*, 250–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shanley, D.P.; Aw, D.; Manley, N.R.; Palmer, D.B. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 374–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Solana, R.; Villanueva, J.L.; Pena, J.; De la Fuente, M. Cell mediated immunity in aging. *Comp. Biochem. Physiol.* **1991**, *99*, 1–4. [[CrossRef](#)]
18. Pawelec, G.; Adibzadeh, M.; Solana, R.; Beckman, I. The T-cell in the aging individual. *Mech. Aging Dev.* **1997**, *93*, 35–45. [[CrossRef](#)]
19. Hallgren, H.M.; Bergh, N.; Rodysill, K.J.; O'Leary, J.J. Lymphocyte proliferative response to PHA and anti-CD3/Ti monoclonal antibodies T cell surface marker expression, and serum IL-2 receptor levels as biomarkers of age and health. *Mech. Aging Dev.* **1998**, *43*, 175–185. [[CrossRef](#)]
20. Wikby, A.; Ferguson, F.; Forsey, R.; Thompson, J.; Strindhall, J.; Lofgren, S.; Nilsson, B.O.; Ernerudh, J.; Pawelec, G.; Johansson, B. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: Impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2005**, *60*, 556–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. De la Rosa, O.; Pawelec, G.; Peralbo, E.; Wikby, A.; Mariani, E.; Mocchegiani, E.; Tarazona, R.; Solana, R. Immunological biomarkers of ageing in man: Changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*. **2006**, *7*, 471–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Murasko, D.M.; Weiner, P.; Kaye, D. Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin. Exp. Immunol.* **1987**, *70*, 440–448. [[PubMed](#)]
23. Sansoni, P.; Brianti, V.; Fagnoni, F.; Snelli, G.; Marcato, A.; Passeri, G.; Monti, D.; Cossarizza, A.; Franceschi, C. NK cell activity and T-lymphocyte proliferation in healthy centenarians. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *663*, 505–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Arranz, L.; Lord, J.M.; De la Fuente, M. Preserved ex-vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age*. **2010**, *32*, 451–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Franceschi, C.; Bonafè, M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 457–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Salvioli, S.; Capri, S.; Valensin, S.; Tieri, P.; Monti, D.; Ottaviani, E.; Franceschi, C. Inflamm-aging, cytokines and aging: State of the art, new hypothesis on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 3161–3171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Mooradian, A.D.; Reed, R.L.; Osterweil, D.; Scuderi, P. Detectable serum levels of tumor necrosis factor α may predict early mortality in elderly institutionalized patients. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1991**, *39*, 891–894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Harris, T.B.; Ferrucci, L.; Tracy, R.P.; Corti, M.C.; Wacholder, S.; Ettinger, W.H., Jr.; Heimovitz, H.; Cohen, H.J.; Wallace, R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.* **1999**, *106*, 506–512. [[CrossRef](#)]
29. Ferrucci, L.; Harris, T.B.; Guralnik, J.M.; Tracy, R.P.; Corti, M.C.; Cohen, H.J.; Penninx, B.; Pahor, M.; Wallace, R.; Havlik, R.J. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1999**, *47*, 639–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Renshaw, W.; Rockwell, J.; Engleman, C.; Gewirtz, A.; Katz, J.; Sambhara, S. Cutting edge: Impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4697–4701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Boehmer, E.D.; Meehan, M.J.; Cutro, B.T.; Kovacs, E.J. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated proinflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 1305–1313.
32. Franceschi, C.; Campisi, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69*, S4–S9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Franceschi, C.; Monti, D.; Cossarizza, A.; Fagnoni, F.; Passeri, G.; Sansoni, P. Aging, longevity and cancer: Studies in Down's syndrome and in centenarians. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *621*, 428–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sharon, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.* **1983**, *34*, 213–298. [[PubMed](#)]
35. Hirokawa, K. Immunity and aging. In *Principles and Practice of Geriatric Medicine*; Pathy, M.S.J., Sinclair, A.J., Eds.; John Wiley and Sons Ltd.: London, UK, 1998; Volume 3, pp. 35–47.
36. Pawelec, G.; Effros, C.; Caruso, C.; Remarque, E.; Barnett, Y.; Solana, R. T cells and aging. *Front. Biosci.* **1999**, *4*, 216–269. [[CrossRef](#)]
37. Salam, N.; Rane, S.; Das, R.; Faulkner, M.; Gund, R.; Kandpal, U.; Lewis, V.; Mattoo, H.; Prabhu, S.; Ranganathan, V.; et al. T cell ageing: Effects of age on development, survival & function. *Indian J. Med. Res.* **2013**, *138*, 595–608. [[PubMed](#)]
38. Pahlavani, M.A.; Harris, M.D. Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 903–913. [[CrossRef](#)]
39. Gougerot-Pocidalo, M.A.; Fay, M.; Roche, Y.; Chollet-Martin, S. Mechanisms by which oxidative injury inhibits the proliferative response of human lymphocytes to PHA. Effect of the thiol compound 2-mercaptoethanol. *Immunology* **1988**, *64*, 281–288. [[PubMed](#)]
40. Schieber, M.; Chande, N.S. ROS Function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R453–R462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Vida, C.; González, E.M.; De la Fuente, M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 4656–4678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Vida, C.; de Toda, I.M.; Cruces, J.; Garrido, A.; Gonzalez-Sanchez, M.; De la Fuente, M. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 423–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Effros, R.B.; Pawelec, G. Replicative senescence of T cells: Does the hayflick limit lead to immune exhaustion? *Immunol. Today* **1997**, *18*, 450–454. [[CrossRef](#)]
44. Fülöp, T.; Larbi, A.; Pawelec, G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Russell, J.H. Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* **1995**, *7*, 382–388. [[CrossRef](#)]
46. Kabelitz, D.; Janssen, O. Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front. Biosci.* **1997**, *2*, 61–77. [[CrossRef](#)]
47. Marrack, P.; Scott-Browne, J.; MacLeod, M.K. Terminating the immune response. *Immunol. Rev.* **2010**, *236*, 5–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Arakaki, R.; Yamada, A.; Kudo, Y.; Hayashi, Y.; Ishimaru, N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FASL expression. *Crit. Rev. Immunol.* **2014**, *34*, 301–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Boyman, O.; Sprent, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 180–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. LaRock, C.N.; Todd, J.; LaRock, D.L.; Olson, J.; O'Donoghue, A.J.; Robertson, A.A.B.; Cooper, M.A.; Hoffman, H.M.; Nizet, V. IL-1 β is an innate immune sensor of microbial proteolysis. *Sci. Immunol.* **2016**, *1*, eaah3539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *CSH. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a016295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Veldhoen, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 612–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Simioni, P.U.; Costa, E.H.; Tamashiro, W.M. Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 1111–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Shaw, A.C.; Goldstein, D.R.; Montgomery, R.R. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 875–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Brüünsgaard, H.; Pedersen, B.K. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* **2003**, *23*, 15–39. [[CrossRef](#)]
56. Oberley, L.W.; Oberley, T.D.; Buettner, G.R. Cell division in normal and transformed cells: The possible role of superoxide and hydrogen peroxide. *Med. Hypotheses* **1981**, *7*, 21–42. [[CrossRef](#)]
57. Kim, B.Y.; Han, M.J.; Chung, A.S. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 686–698. [[CrossRef](#)]
58. Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *908*, 244–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Salvioli, S.; Monti, D.; Lanzarini, C.; Conte, M.; Pirazzini, C.; Giulia Bacalini, M.; Garagnani, P.; Giuliani, C.; Fontanesi, E.; Ostan, R.; et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity—Inflamm-aging reappraised. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 1675–1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Minciullo, P.L.; Catalano, A.; Mandraffino, G.; Casciaro, M.; Crucitti, A.; Maltese, G.; Morabito, N.; Lasco, A.; Gangemi, S.; Basile, G. Inflammaging and anti-inflammaging: The role of cytokines in extreme longevity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2016**, *64*, 111–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Dimitrijević, M.; Aleksić, I.; Vujić, V.; Stanojević, S.; Pilipović, I.; von Hörsten, S.; Leposavić, G. Peritoneal exudate cells from long-lived rats exhibit increased IL-10/IL-1 β expression ratio and preserved NO/urea ratio following LPS-stimulation in vitro. *Age* **2014**, *36*, 9696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Shin, D.I.; Banning, U.; Kim, Y.M.; Verheyen, J.; Hannen, M.; Bönig, H.; Körholz, D. Interleukin 10 inhibits TNF- α production in human monocytes independently of interleukin 12 and interleukin 1 β . *Immunol. Investig.* **1999**, *28*, 165–175. [[CrossRef](#)]
63. Dagvadorj, J.; Naiki, Y.; Tumurkhuu, G.; Hassan, F.; Islam, S.; Koide, N.; Mori, I.; Yoshida, T.; Yokochi, T. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through reduced MyD88 expression. *Innate Immun.* **2008**, *14*, 109–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Van Den Biggelaar, A.H.; De Craen, A.J.; Gussekloo, J.; Huizinga, T.W.; Heijmans, B.T.; Frolich, M.; Kirkwood, T.B.; Westendorp, R.G. Inflammation underlying cardiovascular mortality is a late consequence of evolutionary programming. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1022–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Krabbe, K.S.; Pedersen, M.; Bruunsgaard, H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* **2004**, *39*, 687–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ventura, M.T.; Scichilone, N.; Paganelli, R.; Minciullo, P.L.; Patella, V.; Bonini, M.; Passalacqua, G.; Lombardi, C.; Simioni, L.; Ridolo, E.; et al. Allergic diseases in the elderly: Biological characteristics and main immunological and non-immunological mechanisms. *Clin. Mol. Allergy* **2017**, *15*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Alvarado, C.; Alvarez, P.; Puerto, M.; Gausserès, N.; Jiménez, L.; De la Fuente, M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* **2006**, *22*, 767–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Hsp70 basal levels, a tissue marker of the rate of aging and longevity in mice

Irene Martínez de Toda ^{a,b}, Carmen Vida ^{a,b}, Eduardo Ortega ^c, Mónica De La Fuente ^{a,b,*}

^a Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

^b Institute of Investigation, Hospital 12 Octubre, Madrid

^c Department of Physiology, University of Extremadura, Badajoz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 January 2016

Received in revised form 23 August 2016

Accepted 26 August 2016

Available online 28 August 2016

Section Editor: Chennai Guest Editor

Keywords:

Hsp70

Basal level

Aging

Longevity

Biomarker

Premature aging

ABSTRACT

Under stressful conditions, the expression of the chaperone Hsp70 is induced, which acts as a cellular defense mechanism. The impairment in this induction has been related to aging, whereas an increased expression has been related to longevity. Nevertheless, it is still not known if the basal levels of Hsp70 can be indicative of the aging rate of different tissues. The aim of this study was to quantify the basal levels of Hsp70 in tissues from female mice throughout their aging process including long-lived mice, as well as from prematurely aging mice (PAM). Adult, old and long-lived (6, 18 and 30 months of age, respectively) female ICR-CD1 and Balb/C mice were used. Tissues with mainly mitotic (liver and renal medulla) or post-mitotic (heart, renal cortex, cerebral cortex, spleen) cells and peritoneal leukocytes from these animals as well as from adult PAM and non-prematurely aging mice (NPAM), were studied. Basal levels of Hsp70 were assessed using an ELISA method. The results showed that the aging-associated variation of the levels of Hsp70 followed a different pattern in post-mitotic and mitotic tissues, being lower or higher in old mice comparing to adults, respectively. In all the tissues analyzed the Hsp70 levels from long-lived mice were similar to those from adult animals. In addition, in adult PAM these Hsp70 levels were similar to those in chronologically old animals. In conclusion, Hsp70 basal levels show tissue-specific age-associated variations and are preserved in long-lived animals, demonstrating their role as markers of the rate of aging and longevity.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The preservation of homeodynamics through the balance between damage and repair is critical for ensuring cell and organism survival. However, when individuals age the ability to respond, counteract and adapt to internal and external sources of disturbance gets progressively impaired, so being unable to re-establish homeodynamics (Demirovic and Rattan, 2013), which leads to the age-related increase in morbidity and mortality (De La Fuente and Miquel, 2009). Thus, a diminished capacity to cope with stressful situations has been related to accelerated aging and a shorter lifespan (Vida et al., 2014). In this regard, a model of premature aging based on an altered stress-related behavior response has been proposed in our laboratory. These adult prematurely aging mice (PAM) are identified by their poor response (excess of reactivity to stress and anxiety state) in a simple T-maze exploration test. These mice showed premature aging in immune, nervous and endocrine systems as well as a shorter lifespan than other mice with the same chronological age that do not show this inappropriate response to a

stressful situation (Pérez-Álvarez et al., 2005; Viveros et al., 2007) supporting the evidences that the neuro-endocrine-immune communication is disrupted during the aging process (Fabris, 1991; De La Fuente and Miquel, 2009). In addition, longevity is thought to be achieved through the maintenance of the ability of individuals to deal with different stresses. In relation to this, nematodes, fruit flies and mice long-lived mutant strains are significantly more resistant to multiple forms of stress (Nakanishi and Yasumoto, 1997; Murakami et al., 2000).

The response to stress is controlled at the molecular level by a number of highly conserved signalling molecules and transcriptional regulators. Heat shock proteins (Hsp), also termed stress proteins, are highly conserved molecules found in all cellular organisms. Under physiological conditions, these proteins are expressed at low levels. However, pathological and physiological stressful stimuli increase the synthesis of intracellular Hsp through a mechanism known as the heat-shock response (HSR) (Lindquist, 1986). The Hsp70 family constitutes the most conserved and best-studied class of Hsp. This family includes constitutively expressed Hsp70 (Hsc70; 73 kDa) and stress-inducible Hsp70 (Hsp72; 72 kDa). In response to cellular stress, heat shock factor 1 (HSF1) trimerizes and initiates a sequence of events including robust activation of the Hsp70 promoter. The increased level of Hsp70 protects stressed cells by binding and processing unfolded, misfolded, and

* Corresponding author at: Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain.

E-mail address: mondela@bio.ucm.es (M. De La Fuente).

aberrant proteins (Liberek et al., 2008) and from further stressful stimuli (Oksala et al., 2014). Thereby, Hsp70 (the product of the HSPA1A gene) is a crucial protein in cellular homeodynamics and increases rapidly from a low basal level to high levels in response to a variety of stresses. Thus, HSR is one of the main cellular stress responses, which works to bring the cell state back into balance (Demirovic et al., 2013). In addition, maintaining the basal level of Hsp70 is necessary for the preservation of homeodynamics given that these levels regulate several critical cellular functions including protein folding and transport, apoptosis and inflammation (De Toda and De la Fuente, 2015).

What do we expect from the relation between aging and Hsp70? Oxidative and inflammatory stress is a key feature in aging and in the induction of Hsp70. Then, it could be reasonable to expect higher levels of Hsp70 in aged individuals. However, with aging the HSR experiences an impairment as well as the induction of Hsp70 after an acute stress (Verbeke et al., 2001). Indeed, prematurely aged mice also show a decreased ability to induce Hsp70 after a stressful stimulus (Nakanishi and Yasumoto, 1997). Nevertheless, human centenarians do not experience this deterioration of Hsp70 induction, since they synthesize it in response to a given stress as if they were young (Ambra et al., 2004).

Whereas the age-related deficit in the induction of Hsp70 after an acute stress has been widely documented, the age-related variations of the Hsp70 basal levels have been less studied thereby existing many controversial results depending on the animal, strain and tissue studied as well as of the antibody used. The common trigger of Hsp70 production is the intracellular accumulation of incomplete, damaged or modified proteins. Thus, in aged subjects, post-translational modified proteins and advanced glycosylation end products (AGEs), which accumulate in tissues, might chronically stimulate Hsp70 production and affect the basal synthesis of this cell defense system. Moreover, different hormetic treatments such as heat shock, caloric restriction or exercise, which acutely induce the synthesis of Hsp70 and result in an increased constitutive expression of this protein, produce an increase in lifespan (Söti and Csermely, 2000; Bonelli et al., 2008). This fact points to the possible implication of Hsp70 basal levels in longevity.

For a better understanding of the importance that a specific protein has in the aging process, the study of it in naturally long-lived individuals (which are known to experience a “healthy aging”) as well as in prematurely aged subjects (which are known to age at a faster rate) becomes a really useful approach. Although Hsp70 induction studies after different acute stresses have been performed in these groups (Nakanishi and Yasumoto, 1997; Ambra et al., 2004), no study has yet been conducted on the Hsp70 basal levels either in long-lived nor in prematurely aged individuals. Moreover, the possible different age-related changes in these levels depend on the characteristic of mitotic or post-mitotic tissue have not been studied. Thus, in order to gain insight into the role that the basal levels of Hsp70 have in the aging context, the analysis of Hsp70 basal levels in several tissues (mitotic and post-mitotic; due to their different aging rate) from ICR-CD1 and Balb/C female mice at the adult and old age was performed. The Hsp70 basal levels were also quantified in the same tissues from those ICR-CD1 and Balb/C mice, which naturally reached high longevity as well as in those tissues from adult prematurely aging mice (PAM). In addition, since there is an age-related increase of oxidative stress and Hsp70 levels are associated to oxidative damage, the malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, aging and life span (Dmitriev and Titov, 2010), was analyzed.

2. Material and methods

2.1. Animals

For this study, ex-reproductive females of outbred ICR/CD-1 and inbred Balb/C mice (*Mus musculus*) strains were used, purchased from Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain) at the young adult age (28 ± 4 weeks). The mice were specifically pathogen free as tested by

Harlan according to the Federation of European Laboratory Science Association recommendations. They were housed at 6 ± 1 per cage and maintained at a constant temperature (22 ± 2 °C) in sterile conditions inside an aseptic air negative pressure environmental cabinet (Flufrance, Cachan, France), on a 12/12 h reversed light/dark cycle (lights on at 8 pm). Mice had access to tap water and standard Sander Mus pellets (A04 diet; Panlab, Barcelona, Spain) ad libitum. Diet was in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition for laboratory animals. This cross-sectional study was performed simultaneously on mice of different ages, namely adult (40 ± 4 weeks, $n = 12$), old (82 ± 4 weeks, $n = 12$) and long lived (120 ± 4 weeks, $n = 6$). Each age group category was formed by animals that had been purchased from the same set. The long-lived mice had naturally achieved healthy and successful aging because the average life span for females of ICR/CD1 mice strain is 91.9 ± 5.6 weeks (Guayerbas et al., 2002) and the average longevity for females of BALB/c mice strain in our Animal House is 99 ± 5 weeks (unpublished observation). The percentage of these females that reach exceptional longevity is approximately 7%–10%, as happened in the present work and in previous studies (Arranz et al., 2010). Not all animals provided the full set of data. Non-prematurely aging mice (NPAM, $n = 8$) and prematurely aging mice (PAM, $n = 8$) were also used (see below). For the quantification of the Hsp70 basal levels in PAM and NPAM another simultaneously study was performed at the same time in chronologically adult ($n = 8$) and old ($n = 8$) ICR-CD1 mice. Mice were treated according to the guidelines of the European Community Council Directives (86/6091 EEC).

2.2. Prematurely aging mice (PAM)

Adult (24 ± 1 weeks of age) female outbred ICR-CD1 mice were classified as prematurely aged mice (PAM) and non-prematurely aged mice (NPAM) according to their different behavior in a T-maze, as previously described (Viveros et al., 2007). This T-shaped maze essentially consists of three arms made of wood, whose internal surfaces are covered with black methacrylate. The inside dimensions of each arm are 10 cm wide, 25 cm long, and 10 cm high. The floor is made of 3 mm-thick cylindrical aluminum rods placed perpendicularly to the side walls. The test is carried out by holding the mouse by the tip of its tail and placing it inside the “vertical” arm of the maze with its head facing the end wall. Its performance is evaluated with a chronometer to measure the time the animal takes to cross the intersection of the three arms with both hind legs. This test was performed four times, once a week, to sort the PAM (that required >10 s to complete exploration of the first arm on each of the four tests) from the NPAM (which completed the exploration in <10 s). Animals showing an intermediate response to the T-maze (26% of total population) were removed from the study.

2.3. Organ extraction

Animals were sacrificed in the dark phase of its cycle (8:00–14:00 h) by cervical dislocation. Organs were extracted immediately, the excess of fat was removed and they were washed carefully with sterilized PBS pH 7.4. Liver, kidney, heart, brain and spleen were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until performing the Hsp70 ELISA assay. Frozen kidneys were split into medulla and cortex. From the brain, the anterior cerebral cortex was chosen for this study. From the heart, the left side including the auricle and ventricle was selected.

2.4. Collection of peritoneal leukocytes

Peritoneal suspensions were collected between 8 am and 10 am, to minimize circadian variations, without killing the animals. Mice were held by the cervical skin, the abdomen was cleansed with 70% ethanol and 3 mL of sterile Hank's solution, previously tempered at 37 °C, was injected intraperitoneally. After massaging the abdomen, 80% of the

injected volume was recovered. Peritoneal leukocytes, mainly lymphocytes, macrophages, and NK cells were identified by their morphology and quantified in Neubauer chambers using optical microscopy ($\times 40$) and adjusted to 3×10^6 of total cells. Cellular viability, routinely checked before and after each experiment by the Trypan Blue (Sigma, St Louis, MO) exclusion test, was higher than $99 \pm 1\%$ in all cases.

2.5. Hsp70 ELISA assay

Frozen samples were thawed on ice after addition of the extraction buffer from the Hsp70 EIA Kit (Enzo Life Sciences, EDKS-700B, for measuring induced Hsp70 (Hsp72) and homogenized with a tissue homogenizer (Omni International, TH2000) for 15 s. Peritoneal suspensions were adjusted to 3 million of total cells, centrifuged at 1100g for 10 min and pellet was resuspended in the extraction buffer provided with the kit. Both tissue and cell samples, following a 30-min incubation on ice, were sonicated with 3 pulses on level 7 (Sonic Dismembrator 60, Fisher Scientific) and then centrifuged at 20,000g for 30 min. The supernatant was diluted 1:4 using the component in the Hsp70 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit. 100 μ l duplicates were used in the ELISA assay and the remaining supernatant was used for a protein analysis. Each 96-well ELISA plate contained duplicates of samples (1–2 mg protein) and Hsp70 standards (1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, and 0 ng). The protocol provided with the Hsp70 ELISA Kit was followed without modifications, for quantification of Hsp70 protein levels. A Multiskan Plus (Thermo Scientific) was used to measure absorbance at 450 nm and the data was analyzed using Ascent for Multiskan. The results were expressed as ng of Hsp70 per milligram of protein.

2.6. Malondialdehyde (MDA) assay

Lipid peroxidation levels were determined by measuring the formation of malondialdehyde (MDA) using a commercial kit (BioVision, Inc., Mountain View, CA, USA). Peritoneal suspensions were adjusted to 1 million of total cells, centrifuged at 1100g for 10 min and pellet was resuspended in 300 μ l MDA lysis buffer with 3 μ l BHT ($\times 100$), sonicated and then centrifuged (13,000g, 10 min). The supernatants (200 μ l) from each sample were added to 600 μ l of thiobarbituric acid (TBA) and incubated in a water bath at 95 $^{\circ}$ C for 60 min. The samples were cool in ice for 10 min and 200 μ l (from each 800 μ l reaction mixture)

were placed into a 96-well microplate for spectrophotometric measurement at 532 nm. MDA supplied in the kit was used as the standard, and MDA levels were determined by comparing the absorbance of samples with that of standards. The results were expressed as nmol of MDA per milligram of protein.

2.7. Protein concentration

Protein concentration of the samples was measured following bicinchoninic acid protein assay kit protocol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

2.8. Statistical analysis

SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis of the results. All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Normality of the samples and homogeneity of the variances were checked by the Kolmogorov-Smirnov test and Levene test, respectively. Differences due to age were studied through the one-way analysis of variance. The Tukey test was used for post hoc comparisons when variances were homogeneous, whereas its counterpart analysis Games–Howell was used with unequal variances when they were not homogeneous. A two-sided *p* value of <0.05 was selected as the point of minimal statistical significance in every comparison.

3. Results

3.1. Hsp70 basal levels in mitotic tissues (liver and renal medulla)

The results obtained from the mitotic tissues studied are shown in Fig. 1. In the liver of both ICR-CD1 and Balb/C mice, higher Hsp70 basal levels were found in old animals ($p < 0.01$; $p < 0.001$, respectively) compared to the adult mice (Fig. 1A; 1B). In both strains, the naturally long-lived group of mice showed lower Hsp70 basal levels in liver than the old group ($p < 0.01$ in ICR-CD1 mice and $p < 0.001$ in Balb/C mice), and these levels were similar to those found in the adult group.

In the renal medulla of both ICR-CD1 and Balb/C mice, higher levels of Hsp 70 were found in the old group ($p < 0.001$ for both strains) with respect to the adult group (Fig. 1C; 1D). In both strains, the naturally long-lived group of mice again showed lower Hsp70 levels than the

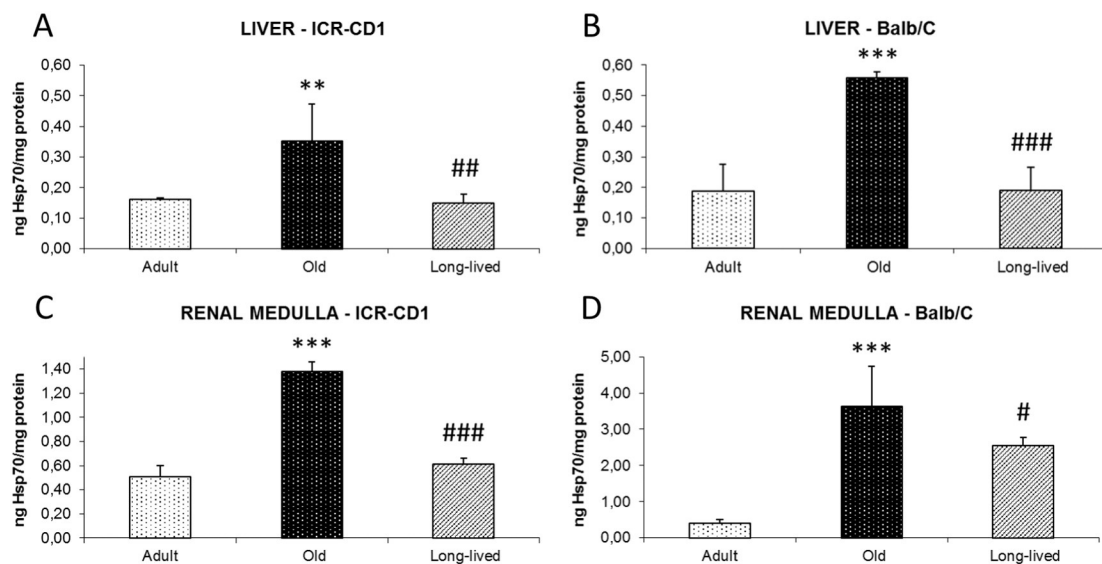


Fig. 1. Age-related variation of Hsp70 basal levels in mitotic tissues. A) Liver of ICR-CD1 mice; B) Liver of Balb/C mice; C) Renal medulla of ICR-CD1 mice and D) Renal medulla of Balb/C mice. Each column represents the mean \pm standard deviation of 6–12 values and each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, with respect to the value in adult animals. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ with respect to the value in old mice.

old group ($p < 0.001$ in ICR-CD1 mice and $p < 0.05$ in Balb/C mice) and similar values to those found in adult ICR-CD1 mice.

3.2. Hsp70 basal levels in post-mitotic tissues (heart, renal cortex, cerebral cortex and spleen)

With regard to post-mitotic tissues (Fig. 2), in the heart of both ICR-CD1 and Balb/C mice, lower Hsp70 basal levels were found in old animals ($p < 0.01$ for both strains) compared to the adult mice (Fig. 2A, B). In both strains, the naturally long-lived group of mice showed higher Hsp70 levels in the heart than the old group ($p < 0.001$ in ICR-CD1 mice, $p < 0.01$ in Balb/C mice), and these levels were similar to those found in adults.

In the renal cortex of both ICR-CD1 and Balb/C mice, lower Hsp70 basal levels were found in old animals ($p < 0.01$ in ICR-CD1 mice; $p < 0.05$ in Balb/C mice) compared to the adults (Fig. 2C, D). In both strains, the naturally long-lived group of mice showed higher Hsp70 basal levels in the renal cortex than the old group ($p < 0.01$ for both strains), and these levels were similar to those found in the adult group.

In the cerebral cortex of both ICR-CD1 and Balb/C mice, lower Hsp70 basal levels were found in old animals ($p < 0.001$ in ICR-CD1 mice; $p < 0.01$ in Balb/C mice) compared to the adult group (Fig. 2E, F). In both strains, the naturally long-lived group of mice showed Hsp70 levels higher than the old group ($p < 0.001$ for both strains). No significant differences were found between adult and long-lived groups.

In the spleen from ICR-CD1 and Balb/C (Fig. 2G, H) a decrease in the Hsp70 basal levels in the old group was found compared to the adult group ($p < 0.01$ in both strains). The naturally long-lived mice showed higher levels than the old group in both strains ($p < 0.05$ in ICR-CD1 mice; $p < 0.01$ in Balb/C mice) and these levels were similar to those found in the adult group.

3.3. Hsp70 basal levels in prematurely aging mice (PAM)

The results of Hsp70 basal levels in renal medulla (mitotic tissue), cerebral cortex and spleen (post-mitotic tissues) from adult prematurely aging mice (PAM) are shown in Fig. 3. In renal medulla PAM showed higher Hsp70 basal levels ($p < 0.01$) compared to the corresponding NPAM (Fig. 3A). In the cerebral cortex and the spleen of PAM lower

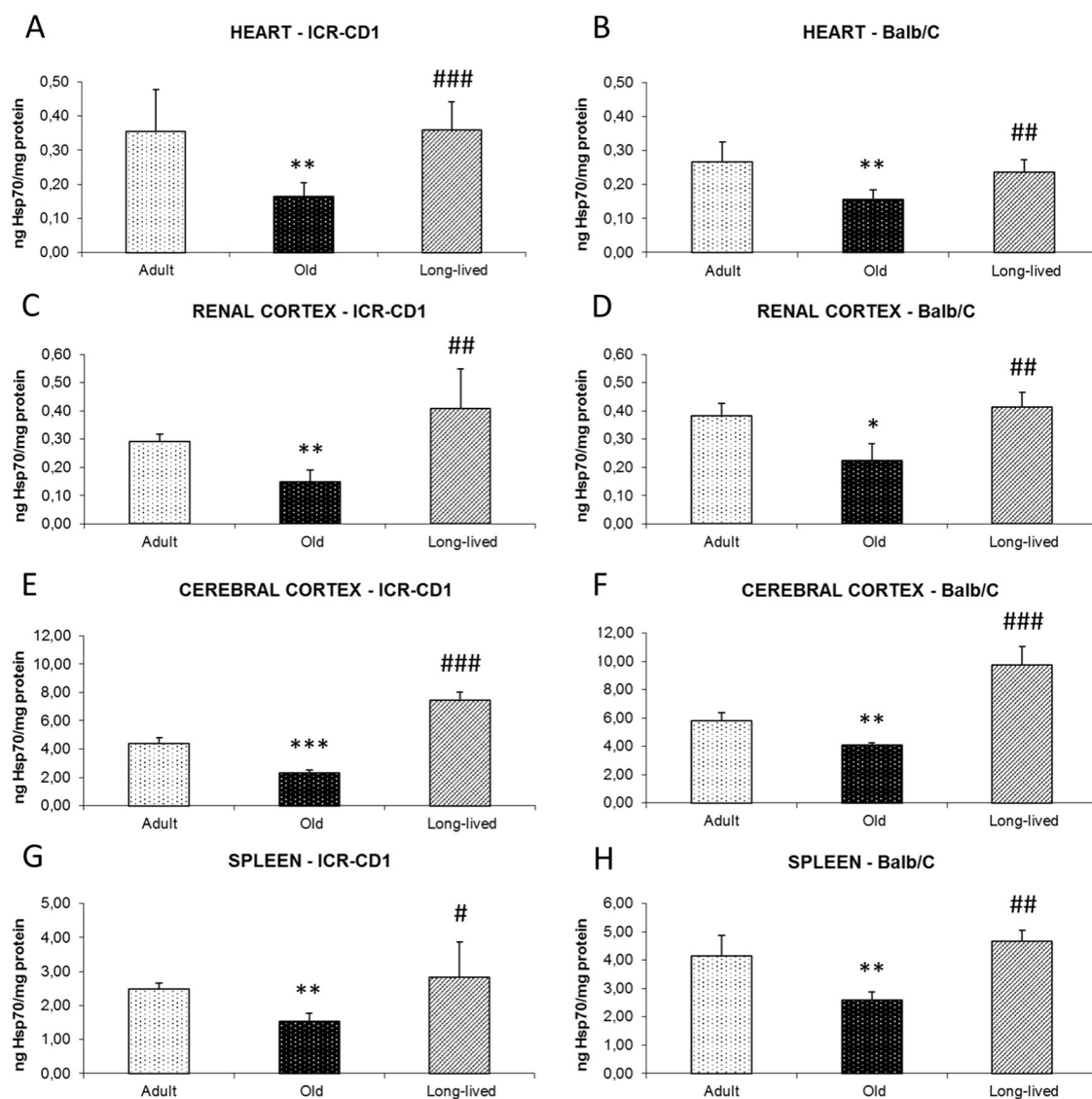


Fig. 2. Age-related variation of Hsp70 basal levels in post-mitotic tissues. A) Heart of ICR-CD1 mice; B) Heart of Balb/C mice; C) Renal cortex of ICR-CD1 mice; D) Renal cortex of Balb/C mice; E) Cerebral cortex of ICR-CD1 mice; F) Cerebral cortex of Balb/C mice; G) Spleen of ICR-CD1 mice and H) Spleen of Balb/C mice. Each column represents the mean \pm standard deviation of 6–12 values and each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ with respect to the value in adult animals. ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ with respect to the value in old animals.

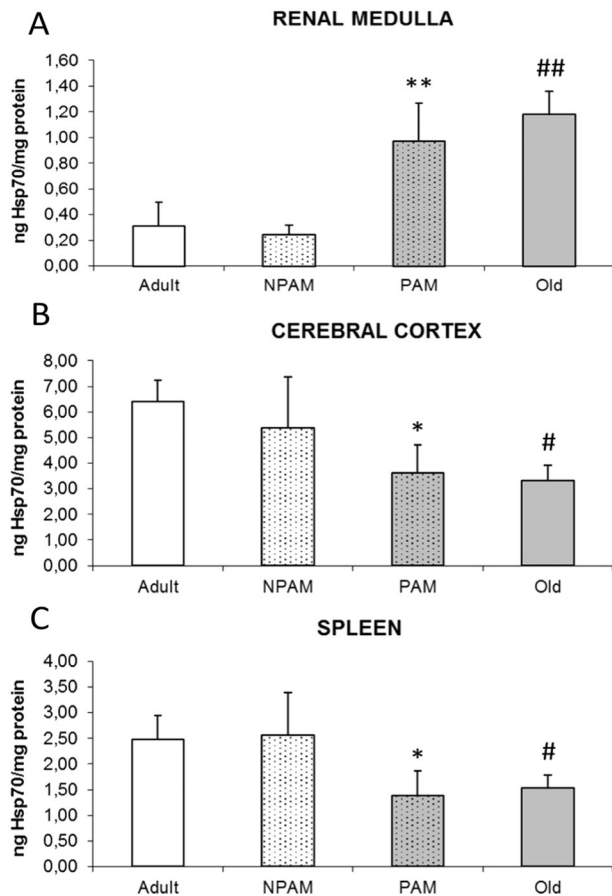


Fig. 3. Hsp70 basal levels in adult prematurely aging mice (PAM) and non-prematurely aging mice (NPAM) compared to chronologically adult and old ICR-CD1 mice. A) Renal medulla; B) Cerebral cortex; C) Spleen. Each column represents the mean \pm standard deviation of 6–8 values and each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ with respect to the value in non-prematurely aging mice (NPAM).

Hsp70 basal levels were detected ($p < 0.05$ in both cases) compared to the NPAM (Fig. 3B, C). In liver, heart and renal cortex no significant differences were detected (Table 1). In all cases the values obtained in PAM were similar to those in chronologically old animals.

3.4. Hsp70 basal levels in peritoneal leukocytes

Hsp70 basal levels were also quantified in peritoneal leukocytes. The results show that the age-related Hsp70 variation in peritoneal leukocytes follows the same pattern as was found in the spleen. Thus, lower Hsp70 basal levels were detected in old mice ($p < 0.001$) compared to the adult animals whereas the naturally long-lived mice showed higher levels than the old group ($p < 0.01$), and similar to those in adults (Fig. 4A). PAM at the adult age have lower Hsp70 basal levels ($p < 0.01$) than NPAM (Fig. 4B) and similar values to those obtained in chronologically old animals.

3.5. Malondialdehyde levels (MDA) in peritoneal leukocytes

Malondialdehyde (MDA) levels were also quantified in peritoneal leukocytes (Fig. 5). The results show higher MDA levels in old mice ($p < 0.001$) compared to the adult animals, whereas long-lived mice keep lipid peroxidation levels as if they were adults, showing lower levels than the old group ($p < 0.001$), and similar to those in adults (Fig. 5A). PAM at the adult age have higher Hsp70 basal levels ($p < 0.01$) than NPAM (Fig. 5B) and similar values to those obtained in chronologically old animals.

Table 1

Hsp70 basal levels in adult prematurely aging mice (PAM) and non-prematurely aging mice (NPAM) compared to chronologically adult and old ICR-CD1 mice.

Tissues	Adult	NPAM	PAM	Old
Liver	0.18 \pm 0.06	0.21 \pm 0.06	0.29 \pm 0.01	0.30 \pm 0.09*
Heart	0.29 \pm 0.12	0.20 \pm 0.03	0.14 \pm 0.06	0.15 \pm 0.04*
Renal cortex	0.28 \pm 0.02	0.31 \pm 0.06	0.26 \pm 0.06	0.17 \pm 0.05*

Each value shown represents the mean \pm standard deviation of 6–8 values and each value being the mean of duplicate assays.

* $p < 0.05$ with respect to the value in adult animals.

4. Discussion

The main contribution of this study is to show that the basal levels of Hsp70 of two strains of mice (ICR-CD1 and Balb/C mice) present age-related changes. These variations are tissue specific and seem to depend on the mainly post-mitotic or mitotic cell composition of those tissues, showing a U-shape or U-shape inverted, respectively. Moreover, in several tissues of prematurely aged adult mice, Hsp70 basal levels are similar to those in chronologically old individuals. These results and the fact that the Hsp70 basal levels are preserved in naturally long-lived mice (comparable to the ones obtained in adults) in all the tissues analyzed, seem to demonstrate the relevance of basal Hsp70 levels as a possible marker of rate of aging and healthy longevity.

In tissues such as liver or renal medulla, which are mainly composed by mitotic cells, higher Hsp70 basal levels were detected in old mice in comparison to the adults. Although in a previous study in liver unchanged Hsp70 levels during aging in rats were reported, the antibody used in that work detected both the constitutively expressed Hsp70 (Hsc70) and the stress-inducible Hsp70 (Hsp72) (Nardai et al., 2002). Thus, the increased Hsp70 basal levels could not be detected if there was a decrease in Hsc70 basal levels. In fact, another study in rats showed an age-related decline in Hsc70 basal levels in the liver (Bonelli et al., 2008). In primary hepatocytes isolated from young and senescent rats an age-related increase in Hsp70 basal levels was also observed (Hall et al., 2001). Moreover, an age-dependant basal Hsp70 accumulation was detected in fibroblasts undergoing aging “in vitro” (Fonager et al., 2002). In tissues such as heart, renal cortex and cerebral cortex, with mainly post-mitotic cells, lower Hsp70 basal levels were detected in old mice compared to the adults. This age-related decline in post-mitotic tissues was also supported by other studies carried out in cerebral cortex (Unno et al., 2000) and in heart (Colotti et al., 2005) of rats. In the spleen, which is principally composed of leukocytes, as well as in peritoneal immune cells, which in basal conditions can be considered post-mitotic cells, lower Hsp70 basal levels were detected in old mice compared to adults. Other studies performed in human monocytes (Njemini et al., 2002) and in human neutrophils (Kovalenko et al., 2014) also showed an age-related decline in Hsp70 basal levels.

Hsp70 is so essential for life and so well conserved across species that the gene encoding this protein (HSPA1A) has been termed “vitagene” by Calabrese et al. (2011, 2012); Cornelius et al., 2013). Moreover, Hsp70, as a cellular defense mechanism, is involved in key cellular aging processes such as proteotoxicity, oxidation, mitochondrial biogenesis, apoptosis, immunosenescence and inflammation, becoming an important component in the regulation of aging and longevity (De Toda and De la Fuente, 2015).

Focusing on the protein quality control system, the different age-related variations of Hsp70 levels can be explained by the different rate of damage accumulation experienced by mitotic and post-mitotic cells. Hence, the higher Hsp70 levels found in mitotic tissues of old mice may show an adaptation to the age-related increase in protein modification such as oxidation and glycation, among others (Calderwood et al., 2009). Thus, the growing number of misfolded polypeptide chains, could titrate out the chaperones from the HSF-1 and

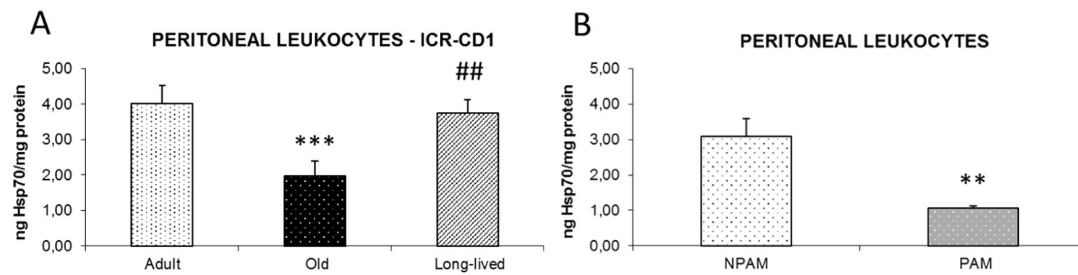


Fig. 4. Hsp70 basal levels in peritoneal leukocytes. A) Chronological aging. B) Premature aging: NPAM and PAM. Each column represents the mean \pm standard deviation of 6–12 values and each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, with respect to the value in adult animals or in NPAM. ## $p < 0.01$, with respect to the value in old animals.

induce a constitutive stress response. According to the oxidative-inflammatory theory of aging, oxidative stress affects primarily post-mitotic cells and consequently post-mitotic tissues are the ones that age at a faster speed, as they do not divide their oxidatively-damaged components such as mitochondria, during cell cycle division (De La Fuente and Miquel, 2009). Based on that, one would expect post-mitotic tissues to be the ones to experience the most marked increase in Hsp70 basal levels during aging. However, a decline in the Hsp70 basal levels was found in those tissues, mainly composed by post-mitotic cells, from old animals. This fact could be due to the inability of these post-mitotic cells from old subjects to compensate for the age-related chronic damage and thus the ability to constitutively express Hsp70 gets impaired in these cells. In fact, in peritoneal leukocytes from old mice higher levels of lipid peroxidation damage (MDA) comparing to those from adult and long-lived mice were observed in the present study. This increased oxidative state was associated to lower Hsp70 basal levels than in adult and long-lived mice. Thus, a possible age-related exhaustion of Hsp70 levels appear in post-mitotic cells as consequence of chronic oxidative stress that suffer these cells. An impairment in the capacity of response to high oxidative state in peritoneal leukocytes from old mice has been previously observed (Arranz et al., 2010). Although further research is needed in order to elucidate the underlying mechanisms of this fact, the age-related redox imbalance in post-mitotic cells could be one of the causes of the inhibition of HSF-1 trimerization (Ahn and Thiele, 2003) and consequently of the decreased Hsp70 synthesis. Another mechanism that could explain this is the RNA interference-mediated post-transcriptional inhibition of Hsp70 due to chronic oxidative stress exposure (Spiró et al., 2012).

Furthermore, the age-related variation of Hsp70 levels observed may be a consequence of aging but it could also be involved in the aging process due to the role that Hsp70 has in abolishing the apoptosis cascade at multiple points (Rérole et al., 2011). This is an intriguing suggestion given that the age-related increased basal synthesis of Hsp70 found in mitotic tissues, could make non-functional mitotic cells resistant to enter apoptosis, which may lead to uncontrolled cell division and cancer. In addition, the age-related decreased basal synthesis of

Hsp70 found in post-mitotic tissues would make these cells more vulnerable to apoptosis, leading to tissue deterioration and aging.

The theory of oxidation and inflammation of aging links chronic oxidative and inflammatory stress with a persistent activation of the transcription factor NF- κ B, and suggests the involvement of the immune system in this activation and in the aging process (De La Fuente and Miquel, 2009). Hsp70, as a “vitaprotein” also takes part in this process. It has been demonstrated that intracellular Hsp70 can operate at many levels of the NF- κ B pathway to inhibit or dampen its activation (Guzhova et al., 1997; Zheng et al., 2008). According to this, the decreased Hsp70 levels found in the immune cells of old mice could contribute to the NF- κ B permanent activation and consequent acceleration of aging, whereas in the immune cells of long-lived mice the higher Hsp70 levels could reflect the maintenance of efficient anti-inflammatory mechanisms.

The changes in Hsp70 found in chronologically old mice are also shown in adult prematurely-aging mice (PAM). These animals are selected on the basis of an inappropriate response to a stress situation and characterized by a premature immunosenescence as well as premature neurochemical and behavioral aging and they have shorter lifespans than the corresponding non-prematurely aging mice (NPAM) of the same age (Pérez-Álvarez et al., 2005; Viveros et al., 2007). These PAM, despite being adults, showed similar Hsp70 levels to those detected in chronologically old mice in renal medulla, cerebral cortex, spleen and peritoneal leukocytes. This supports the concept that Hsp70 is an intrinsic component of the immune-neuro-endocrine network and that an adequate balanced production of this protein can favour successful aging by interfering with oxidative stress and inflammation at peripheral and brain levels exerting neuronal protection, synaptic plasticity, and memory consolidation (Ortega et al., 2012). Thus, the results in these animals are another confirmation that PAM show premature aging as adults.

By their ability to survive well beyond average life expectancy, naturally long-lived individuals of any species would be expected to have withstood the detrimental effects of the aging process better than those individuals who do not live to extreme old age. The study of

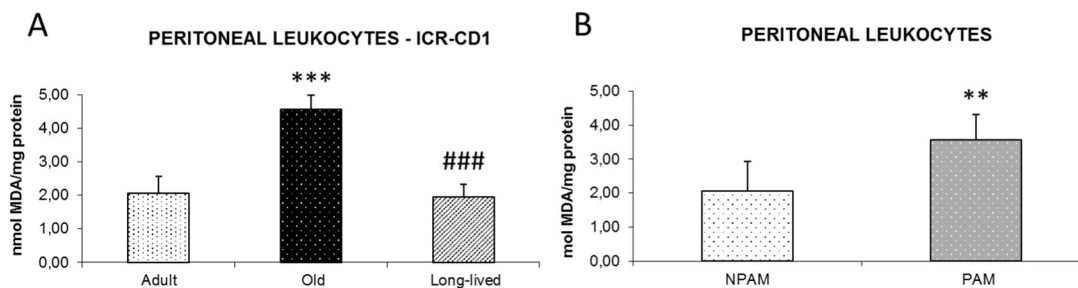


Fig. 5. Lipid peroxidation levels (MDA) in peritoneal leukocytes from ICR-CD1 mice. A) Chronological aging. B) Premature aging: NPAM and PAM. Each column represents the mean \pm standard deviation of 6–12 values and each value being the mean of duplicate assays. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, with respect to the value in adult animals or in NPAM. ### $p < 0.001$, with respect to the value in old animals.

such individuals may thus provide important insights into the aging process and the processes that result in frailty in a wide range of physiological systems (Arranz et al., 2010). In the present study, those individuals that reached an advanced age, maintained lower Hsp70 basal levels in mitotic tissues and increased Hsp70 basal levels in post-mitotic tissues, as if they were adults. One plausible explanation for these results can be that given their correct maintenance of homeodynamic along their whole lifetime, these individuals have experienced less damage accumulation, which is reflected by a lower need of Hsp70 in mitotic cells and by a non-impaired synthesis of Hsp70 in post-mitotic cells. In fact, the levels of MDA observed in peritoneal leukocytes from long-lived mice were similar to those in adults. Another possibility is that this could be an adaptive strategy to improve whole body homeostasis by, on the one hand, promoting the apoptosis of damaged mitotic cells, which can be replaced, for a better whole tissue functioning, and on the other by preventing the apoptosis of post-mitotic cells, which leads to tissue degeneration (De Toda and De la Fuente, 2015). Moreover, in post-mitotic tissues, such as muscle and brain, Hsp70 has been shown to promote mitochondrial biogenesis and regulate the mitochondrial quality control processes of autophagy, fusion and fission (Gaweda-Walerych and Zekanowski, 2013; Drew et al., 2014; Henstridge et al., 2014). In addition, overexpression of Hsp70 has been found to be negatively correlated to the age-related increase of oxidative stress markers in muscle (Broome et al., 2006) extending the lifespan in a model of severe muscular dystrophy (Gehrig et al., 2012) as well as mediating neuroprotection in rat models of stroke and epilepsy (Yenari et al., 1998; Rérole et al., 2011). Thus, the increased levels that long-lived mice show in post-mitotic tissues compared to old mice would ensure proper cell functioning, mitochondria quality control maintenance as well as decreased oxidative stress damage.

Given the wide spectrum of functions described for Hsp70 further research is needed in order to clarify if its involvement in aging and longevity relies on a certain specific function (ameliorating proteotoxicity, counteracting oxidative damage, promoting mitochondria biogenesis, inhibiting apoptosis or dampening the establishment of a pro-inflammatory state), or if it is through a combination of some or all of them. Moreover, the results obtained in the present study show the relevance of tissue Hsp70 basal levels in aging, and although these basal levels might be more modest than those induced by heat shock or other stress insults, the impact of this fact might be more important since show a normal and frequent situation, whereas the capacity to produce very high levels of Hsp70 after heat shock is an extremely rare event.

Nevertheless, despite there being many potential biomarkers that change with aging, the demonstration that prematurely aging mice, which have a shorter lifespan, have Hsp70 basal levels similar to chronologically old individuals whereas naturally long-lived mice maintain Hsp70 basal levels comparable to the ones in adults, seems to demonstrate the relevance of basal Hsp70 levels in lifespan and as a marker of the rate of aging and healthy longevity.

Acknowledgments

This work was supported by grants of the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (BFU2011-30336), Research group of UCM (910379), FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD12/0043/0018) from the ISCIII-FEDER of the European Union.

References

- Ahn, S.-G., Thiele, D.J., 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17, 516–528. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1044503>.
- Ambra, R., Mocchegiani, E., Giacconi, R., Canali, R., Rinna, A., Malavolta, M., Virgili, F., 2004. Characterization of the hsp70 response in lymphoblasts from aged and centenarian subjects and differential effects of in vitro zinc supplementation. *Exp. Gerontol.* 39, 1475–1484.
- Arranz, L., Caamaño, J.H., Lord, J.M., De La Fuente, M., 2010. Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor kappa B. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 65 (A), 941–950.
- Bonelli, M., Desenzani, S., Cavallini, G., Donati, A., Romani, A., Bergamini, E., Borghetti, A., 2008. Low-level caloric restriction rescues proteasome activity and Hsc70 level in liver of aged rats. *Biogerontology* 9, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-007-9111-9>.
- Broome, C.S., Kayani, A.C., Palomero, J., Dillmann, W.H., Mestrl, R., Jackson, M.J., McArdle, A., 2006. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *FASEB J.* 20, 1549–1551.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., Calabrese, E.J., 2011. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol. Asp. Med.* 32, 279–304.
- Calabrese, V., et al., 2012. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1822, 753–783.
- Calderwood, S.K., Murshid, A., Prince, T., 2009. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging – a mini-review. *Gerontology* 55, 550–558. <http://dx.doi.org/10.1159/00025957>.
- Colotti, C., et al., 2005. Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology* 6, 397–406. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-005-4906-z>.
- Cornelius, C., Perrotta, R., Graziano, A., Calabrese, E.J., Calabrese, V., 2013. Stress responses, vitagenes and hormesis as critical determinants in aging and longevity: mitochondria as a “chi”. *Immun. Ageing* 10, 15. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4933-10-15>.
- De La Fuente, M., Miquel, J., 2009. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3003–3026.
- De Toda, I.M., De la Fuente, M., 2015. The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology* 16, 709–721. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-015-9607-7>.
- Demirovic, D., Rattan, S.I.S., 2013. Establishing cellular stress response profiles as biomarkers of homeodynamics, health and hormesis. *Exp. Gerontol.* 48, 94–98.
- Demirovic, D., MartínezdeToda, I., Rattan, S.I.S., 2013. Molecular stress response pathways as the basis of hormesis. *Hormesis in Human Health and Disease* chapter 12. CRC press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 227–241.
- Dmitriev, L.F., Titov, V.N., 2010. Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 9, 200–210.
- Drew, B.G., et al., 2014. HSP72 is a mitochondrial stress sensor critical for parkin action, oxidative metabolism, and insulin sensitivity in skeletal muscle. *Diabetes* 63, 1488–1505. <http://dx.doi.org/10.2337/db13-0665>.
- Fabris, N., 1991. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12, 219–230. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4943\(91\)90029-P](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4943(91)90029-P).
- Fonager, J., Beedholm, R., Clark, B.F.C., Rattan, S.I.S., 2002. Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp. Gerontol.* 37, 1223–1228.
- Gaweda-Walerych, K., Zekanowski, C., 2013. Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance – relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 73, 199–224.
- Gehrig, S.M., et al., 2012. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 484, 394–398.
- Guayrbar, N., Catalán, M., Víctor, V.M., Miquel, J., De la Fuente, M., 2002. Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav. Brain Res.* 134, 41–48.
- Guzhova, I.V., Darieva, Z.A., Melo, A.R., Margulis, B.A., 1997. Major stress protein Hsp70 interacts with NF- κ B regulatory complex in human T-lymphoma cells. *Cell Stress Chaperones* 2, 132–139.
- Hall, D.M., Sattler, G.L., Sattler, C.A., Zhang, H.J., Oberley, L.W., Pitot, H.C., Kregel, K.C., 2001. Aging lowers steady-state antioxidant enzyme and stress protein expression in primary hepatocytes. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Med. Sci.* 56, B259–B267. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/56.6.B259>.
- Henstridge, D.C., et al., 2014. Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes* 63, 1881–1894. <http://dx.doi.org/10.2337/db13-0967>.
- Kovalenko, E.I., et al., 2014. ROS production, intracellular HSP70 levels and their relationship in human neutrophils: effects of age. *Oncotarget* 5, 11800–11812.
- Liberek, K., Lewandowska, A., Ziętkiewicz, S., 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.* 27, 328–335.
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151–1191.
- Murakami, S., Tedesco, P.M., Cypser, J.R., Johnson, T.E., 2000. Molecular genetic mechanisms of life span manipulation in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 40–49. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06634.x>.
- Nakanishi, Y., Yasumoto, K., 1997. Induction after administering paraquat of heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 in the liver of senescence-accelerated mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1302–1306.
- Nardai, G., Cserehely, P., Söti, C., 2002. Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis. *Exp. Gerontol.* 37, 1257–1262.
- Njemini, R., Abele, M.V., Demanet, C., Lambert, M., Vandebosch, S., Mets, T., 2002. Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Immunol.* 22, 195–205. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016036724386>.

- Oksala, N.K.J., et al., 2014. Natural thermal adaptation increases heat shock protein levels and decreases oxidative stress. *Redox Biol.* 3, 25–28.
- Ortega, E., Bote, M.E., Besedovsky, H.O., Rey, A.D., 2012. Hsp72, inflammation, and aging: causes, consequences, and perspectives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1261, 64–71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06619.x>.
- Pérez-Álvarez, L., et al., 2005. Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 965–976.
- Rérole, A.-L., Jego, G., Garrido, C., 2011. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. In: Calderwood, S.K., Prince, T.L. (Eds.), *Molecular Chaperones Methods in Molecular Biology* 787. Humana Press, pp. 205–230. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-295-3_16.
- Söti, C., Csermely, P., 2000. Molecular chaperones and the aging process. *Biogerontology* 1, 225–233.
- Spiró, Z., et al., 2012. RNA interference links oxidative stress to the inhibition of heat stress adaptation. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 890–901. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4161>.
- Unno, K., Asakura, H., Shibuya, Y., Kaiho, M., Okada, S., Oku, N., 2000. Increase in basal level of Hsp70, consisting chiefly of constitutively expressed Hsp70 (Hsc70) in aged rat brain. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Med. Sci.* 55, B329–B335. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/55.7.B329>.
- Verbeke, P., Fonager, J., Clark, B.F.C., Rattan, S.I.S., 2001. Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biol. Int.* 25, 845–857. <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.2001.0789>.
- Vida, C., González, E.M., De la Fuente, M., 2014. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr. Pharm. Des.* 20, 4656–4678. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140130201734>.
- Viveros, M.P., Arranz, L., Hernanz, A., Miquel, J., De la Fuente, M., 2007. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 14, 157–162.
- Yenari, M.A., et al., 1998. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann. Neurol.* 44, 584–591. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410440403>.
- Zheng, Z., Kim, J.Y., Ma, H., Lee, J.E., Yenari, M.A., 2008. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 53–63.

CAPÍTULO TRES: Estudio de la relación existente entre una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales y de fragilidad, y la esperanza de vida alcanzada por cada ratón.

Research Article

Function, Oxidative, and Inflammatory Stress Parameters in Immune Cells as Predictive Markers of Lifespan throughout Aging

Irene Martínez de Toda ^{1,2}, Carmen Vida,^{1,2} Luis Sanz San Miguel,³
 and Mónica De la Fuente ^{1,2}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

²Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain

³Department of Statistics and Operational Research, Faculty of Mathematics, Complutense University, Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Mónica De la Fuente; mondelaf@bio.ucm.es

Received 12 March 2019; Accepted 13 May 2019; Published 2 June 2019

Academic Editor: Victor M. Victor

Copyright © 2019 Irene Martínez de Toda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

According to the oxidative-inflammatory theory of aging, there is a link between the function, the oxidative-inflammatory stress state of immune cells, and longevity. However, it is unknown which immune cell parameters can predict lifespan and if there would be any changes in this prediction, depending on the age of the subject. Therefore, a longitudinal study in mice was performed analysing immune function (chemotaxis of macrophages and lymphocytes, phagocytosis of macrophages, natural killer (NK) activity, and lymphoproliferation capacity), antioxidant (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR) activities as well as reduced glutathione (GSH) concentrations), oxidant (oxidized glutathione (GSSG), superoxide anion, and malondialdehyde (MDA) concentrations), and inflammation-related markers (basal release of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-10) in peritoneal leukocytes from mice at the adult, mature, old, very old, and long-lived ages (40, 56, 72, 96, and 120 \pm 4 weeks of age, respectively). The results reveal that some of the investigated parameters are determinants of longevity at the adult age (lymphoproliferative capacity, lymphocyte chemotaxis, macrophage chemotaxis and phagocytosis, GPx activity, and GSH, MDA, IL-6, TNF- α , and IL-10 concentrations), and therefore, they could be proposed as markers of the rate of aging. However, other parameters are predictive of extreme longevity only at the very old age (NK activity, CAT and GR activities, and IL-6 and IL-1 β concentrations), and as such, they could reflect some of the adaptive mechanisms underlying the achievement of high longevity. Nevertheless, although preliminary, the results of the present study provide a new perspective on the use of function, redox, and inflammatory parameters in immune cells as prognostic tools in aging research and represent a novel benchmark for future work aimed at prediction of lifespan.

1. Introduction

Nowadays, increasing average life expectancy is turning the focus of gerontologists from trying to increase lifespan to experiencing healthy aging by prolonging the so-called “healthspan” [1]. It has been predicted that in 2050, 22% of the world population will be over 60 years old. Thus, many countries are facing an increased prevalence of age-related diseases and increasing healthcare costs given that the rapid rise in older people is accompanied by an increase in the number of subject with chronic age-related diseases, such as

heart disease, lung disease, stroke, cancer, and diabetes [2]. However, some individuals live more than a century without ever suffering from the chronic diseases that afflict most humans much earlier in their lives. Therefore, focus should be placed on the study of those successful phenotypes to assist in the understanding of aging. Thus, centenarians have been shown to retain independence and capability as well as cognition at higher levels for longer than the general population, together with postponed mortality [2–5]. Therefore, their study might help to achieve an extended healthy lifespan for the wider population.

Several theories have been proposed to explain the aging process. The oxidative-inflammatory theory of aging [6] links the age-related increase in oxidative stress [7, 8] with the chronic low-grade inflammation, the so-called “inflamm-aging” [9], through the interplay of the immune system. It is known that the age-related increase in oxidative stress impairs the correct functioning of cells. Given that oxidation and inflammation are interlinked processes, the increase in oxidative stress in immune cells results in an increased release of proinflammatory mediators, giving as a result the age-related establishment of a chronic oxidative and inflammatory stress [6]. According to this theory, a relationship has been found between the oxidative and inflammatory states of immune cells, their functional capacity, and the lifespan of a subject [6]. In this regard, it has been demonstrated that centenarians have immune cell function and redox parameters similar to those in adults, despite their advanced age [10, 11]. However, if they maintain this optimal functionality during their whole lifespan or they undergo some remodelling of these parameters during aging is unknown. Therefore, a deep understanding of these subjects would require their follow-up throughout the aging process to shed light into which changes or adaptations are the “successful ones.” Since a longitudinal study is impossible to carry out in human subjects throughout the whole aging process, mice, which have a mean longevity of 2 years, were used for this work. In addition, peritoneal leukocytes were chosen as a sample of study given that they can be extracted without killing the mouse and in the absence of anaesthesia. This fact allowed the monitoring of mice from the adult age until the natural death of the animals.

Thus, a longitudinal study was performed analysing several functions (macrophage chemotaxis and phagocytosis, natural killer activity, lymphocyte chemotaxis, and lymphoproliferation capacity), redox parameters (catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activities, reduced and oxidized glutathione, and superoxide anion and malondialdehyde concentrations), and inflammatory mediators (basal release of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and IL-10) in peritoneal leukocytes throughout the aging process of mice. This approach allowed us to address three important questions: (i) which markers are the most important predictors of remaining longevity in adult or middle life? (ii) Are the same parameters predictive of successful aging at very advanced age? (iii) Which changes or adaptations an individual experiences throughout his/her lifetime that allow the attainment of extreme longevity?

2. Material and Methods

2.1. Experimental Animals and Extraction of Peritoneal Leukocytes. 40 female outbred ICR/CD1 exreproductive mice (*Mus musculus*) were acquired from Janvier Labs (Germany) when they were 32 ± 4 weeks old. The collection of peritoneal suspensions was performed at the adult (40 ± 4 weeks; $n = 38$), mature (56 ± 4 weeks; $n = 25$), old (72 ± 4 weeks; $n = 15$), very old (96 ± 4 weeks; $n = 11$), and long-lived (120 ± 4 weeks; $n = 3$) ages. Mice were further divided at each age point into adult mice (survivors, $n = 22$; nonsurvivors,

$n = 13$; and long-lived, $n = 3$); mature mice (survivors, $n = 12$; nonsurvivors, $n = 10$; and long-lived, $n = 3$); old mice (survivors, $n = 8$; nonsurvivors, $n = 4$; and long-lived, $n = 3$); and very old mice (survivors, $n = 3$; nonsurvivors, $n = 8$). All the animals had a natural death, whereas when no weight loss (<20%), moribund state, or tumor formation was detected, the cause of death was not further investigated. Leukocytes from peritoneal suspensions were identified by their morphology (macrophages or lymphocytes) and quantified (number of cells/mL) in Neubauer chambers. The measurement of markers was performed using unfractionated peritoneal leukocytes to better reproduce the *in vivo* situation. The peritoneal suspensions were adjusted to a specific number of macrophages, lymphocytes, or total leukocytes, depending on the parameter analysed as described in the corresponding section.

2.2. Analysis of Immune Function Parameters

2.2.1. Chemotaxis. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 cells (macrophages or lymphocytes)/mL in Hank's medium and placed into a Boyden chamber. The number of cells that migrated towards formyl-Met-Leu-Phe was counted and expressed as the Chemotaxis Index, as previously described [11].

2.2.2. Phagocytosis. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 macrophages/mL in Hank's medium and placed into migration inhibition factor (MIF) plates for 30 min. After washing, latex beads were added into the plates and the number of latex beads ingested by 100 macrophages was counted and expressed as the Phagocytic Index, as previously described [11].

2.2.3. Natural Killer (NK) Cytotoxicity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/mL in RPMI 1640 medium and placed into 96-well plates. Murine YAC-1 lymphoma cells were added into wells, and NK activity was assessed by quantifying released lactate dehydrogenase into the medium (Cytotox 96 TM, Promega, Germany). The results were expressed as the percentage of tumor cells killed (% lysis), as previously described [11].

2.2.4. Lymphoproliferative Capacity. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 lymphocytes/mL in RPMI 1640 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) and placed into 96-well plates. The mitogen concanavalin A (Con A) or complete medium was added into wells and incubated for 48 h. Then, ^3H -thymidine was also added and incubated for 24 h. ^3H -Thymidine uptake was quantified in a beta counter both in basal and stimulated conditions, and results were expressed as lymphoproliferation capacity (%), 100% being the counts per minute (cpm) in basal conditions, as previously described [11].

2.3. Determination of Redox Parameters

2.3.1. Catalase (Cat) Activity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/mL in Hank's medium and centrifuged, and cell pellets were resuspended in oxygen-free phosphate buffer 50 mM. Then, they were sonicated and supernatants were

used for the enzymatic reaction together with 14 mM H_2O_2 as substrate. Decomposition of H_2O_2 was measured at 240 nm as previously described [12]. The results were expressed as units (U) of catalase activity/mg protein.

2.3.2. Glutathione Peroxidase (GPx) Activity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/mL in Hank's medium and centrifuged, and cell pellets were resuspended in oxygen-free phosphate buffer 50 mM. Then, they were sonicated and supernatants were used for the enzymatic reaction together with cumene hydroperoxide as a substrate (cumene-OOH) as previously described [12]. Oxidation of NADPH was measured at 340 nm. The results were expressed as units (U) of GPx activity/mg protein.

2.3.3. Glutathione Reductase (GR) Activity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/mL in Hank's medium and centrifuged, and the cell pellets were resuspended in oxygen-free phosphate buffer 50 mM and EDTA 6.3 mM. Then, they were sonicated and supernatants were used for the enzymatic reaction together with oxidized glutathione (GSSG) 80 mM as substrate, as previously described [12]. Oxidation of NADPH was measured at 340 nm. The results were expressed as units (U) of GR activity/mg protein.

2.3.4. Glutathione Concentration. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/mL in Hank's medium and centrifuged, and cell pellets were resuspended in phosphate buffer 50 mM and EDTA 0.1 M, pH 8. Then, they were sonicated and supernatants were used for the quantification of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione by the reaction capacity that GSSG and GSH have with o-phthalaldehyde (OPT) at pH 12 and pH 8, respectively, resulting in the formation of a fluorescent compound, as previously described [12]. Fluorescence was measured at 350 nm excitation and 420 nm emission. Results were expressed as nmol of GSSG and GSH per milligram of protein. Moreover, the GSSG/GSH ratio was calculated for each sample.

2.3.5. Intracellular Superoxide Anion Concentration. Cell suspensions were adjusted to 10^6 macrophages/mL in Hank's medium and mixed with nitroblue tetrazolium (NBT) (1 mg/mL). After 60 min incubation, the reaction was stopped with HCl 0.5 M; samples were centrifuged and supernatants discarded. Intracellular reduced NBT was extracted with dioxan and absorbance was measured at 525 nm, as previously described [12]. Results were expressed as nmol superoxide anion/ 10^6 macrophages.

2.3.6. Malondialdehyde (MDA) Concentration. Determination of MDA concentration was evaluated using the commercial kit "Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit" (BioVision, CA, USA). Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/mL in Hank's medium and centrifuged, and cell pellets were resuspended in MDA lysis buffer. Then, they were sonicated and supernatants were incubated with thiobarbituric acid (TBA) for 60 min in a water bath. Then, samples were centrifuged and supernatants collected and dispensed into 96-well plates for spectrophotometric measurement at 532 nm. Results were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.4. Determination of Inflammatory Parameters

2.4.1. Cytokine Measurement. After incubation of peritoneal immune cells for 48 hours in the absence of any mitogen (basal conditions), supernatants were collected. The basal release of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-10 was measured simultaneously in these supernatants by multiplex luminometry (Beadlyte mouse multiplex cytokine detection system, MHYSTOMAG-70K, Upstate, Millipore).

2.5. Statistical Analysis. Differences between groups of the same age were studied using Student's *t*-test for independent samples. Age-related differences in the group of long-lived mice were studied using Student's *t*-test for paired samples. Two-sided $P < 0.05$ was considered the minimum level of significance. In order to investigate the potential role of the parameters studied as predictors of lifespan, Pearson's correlation coefficients were calculated for each of the parameters studied at each age and the respective lifespan that each individual mouse achieved.

3. Results

Several immune function, redox, and inflammatory parameters were assessed in peritoneal leukocytes from female mice, throughout a longitudinal study, starting at the age of 40 weeks until the natural death of the animals. Each mouse was monitored individually along its aging process. At each age analysed, the results are shown classifying mice into three groups: those that lived until the next age point studied, those that died before the next age point, and the animals that reached extreme longevity.

Regarding immune function parameters (Figure 1), mice of the group that survived until the next age point show, in general, a better immune functionality than those that die. However, differences exist depending on the parameter and the age point investigated. Accordingly, mice that reach extreme longevity also show better immune functions, in general, compared to those that die and in some cases even better than those that live to the next age point studied. When focusing on the age-related changes that those mice that reach extreme longevity undergo, it was found that they experience a decrease in almost all immune functions when they are old followed by a subsequent increase at the very old age, showing optimal immune function values when they are long-lived.

With respect to antioxidant parameters (Figures 2(a)–2(d)), there are almost no differences between those mice that survived until the next age point and those that died. However, the group of mice that reach extreme longevity shows a higher antioxidant capacity, in general, compared to those that die at most of the ages studied. This group of mice that reach high longevity experience an age-related decrease in GSH concentration compared to when they were adults, but they undergo a large increase in GPx and GR activities when they are close to reaching extreme longevity.

In relation to oxidant parameters (Figures 2(e)–2(h)), the group of mice that survive to the next age and those that become long-lived show lower GSSG/GSH ratios and MDA

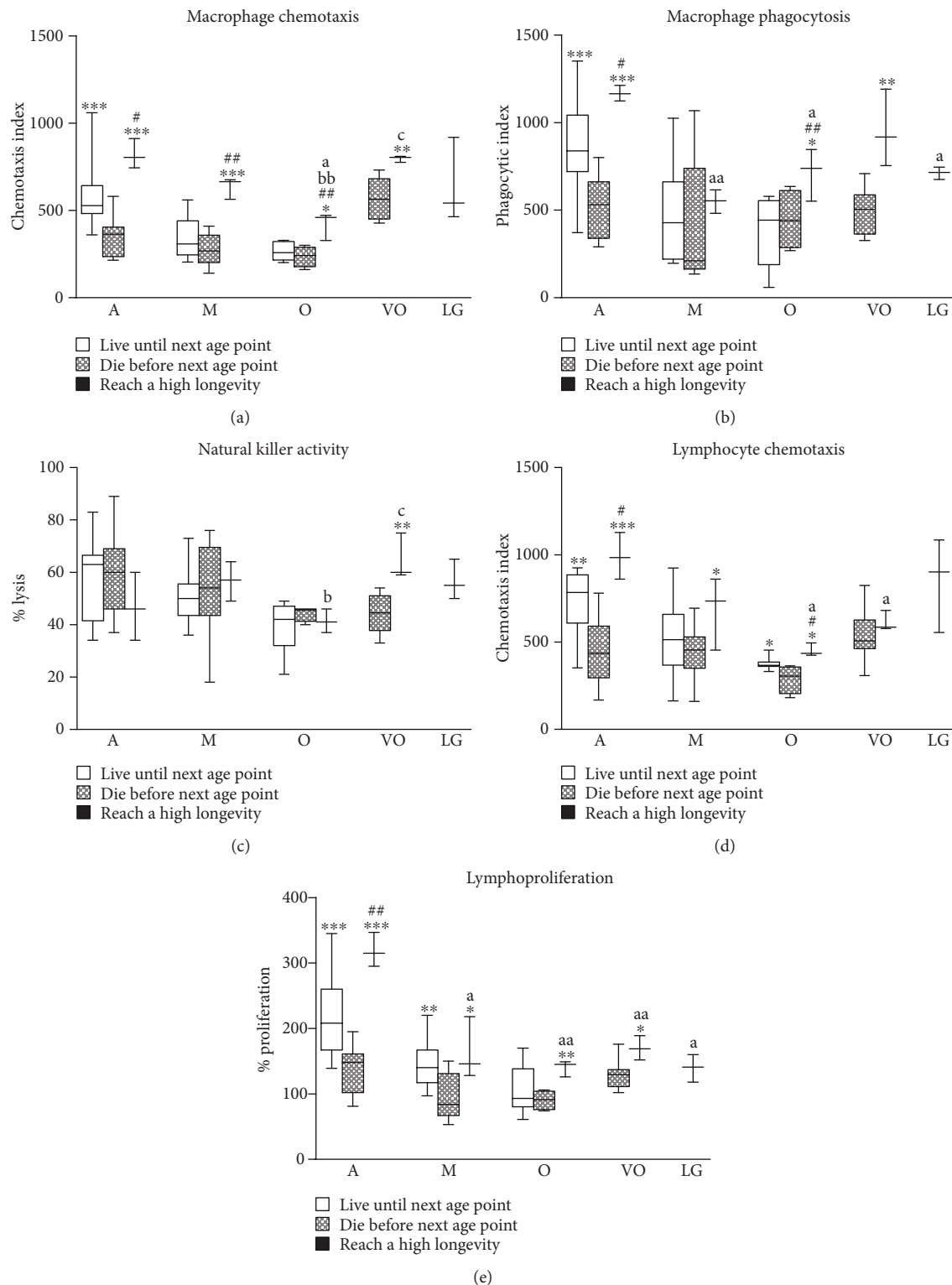


FIGURE 1: Immune function parameters analysed in peritoneal leukocytes from mice throughout a longitudinal study: (a) macrophage chemotaxis; (b) macrophage phagocytosis; (c) natural killer activity; (d) lymphocyte chemotaxis; (e) lymphoproliferation. A: adult mice (40 weeks old; $n = 38$); M: mature mice (56 weeks old; $n = 25$); O: old mice (72 weeks old; $n = 18$); VO: very old mice (96 weeks old; $n = 11$); LG: long-lived mice (120 weeks old; $n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with respect to the group of mice that die before the next age point (Student's t -test for independent samples). a: $P < 0.05$, aa: $P < 0.01$ with respect to adult mice that reach extreme longevity; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$ with respect to mature mice that reach extreme longevity; c: $P < 0.05$ with respect to old mice that reach extreme longevity (Student's t -test for paired samples).

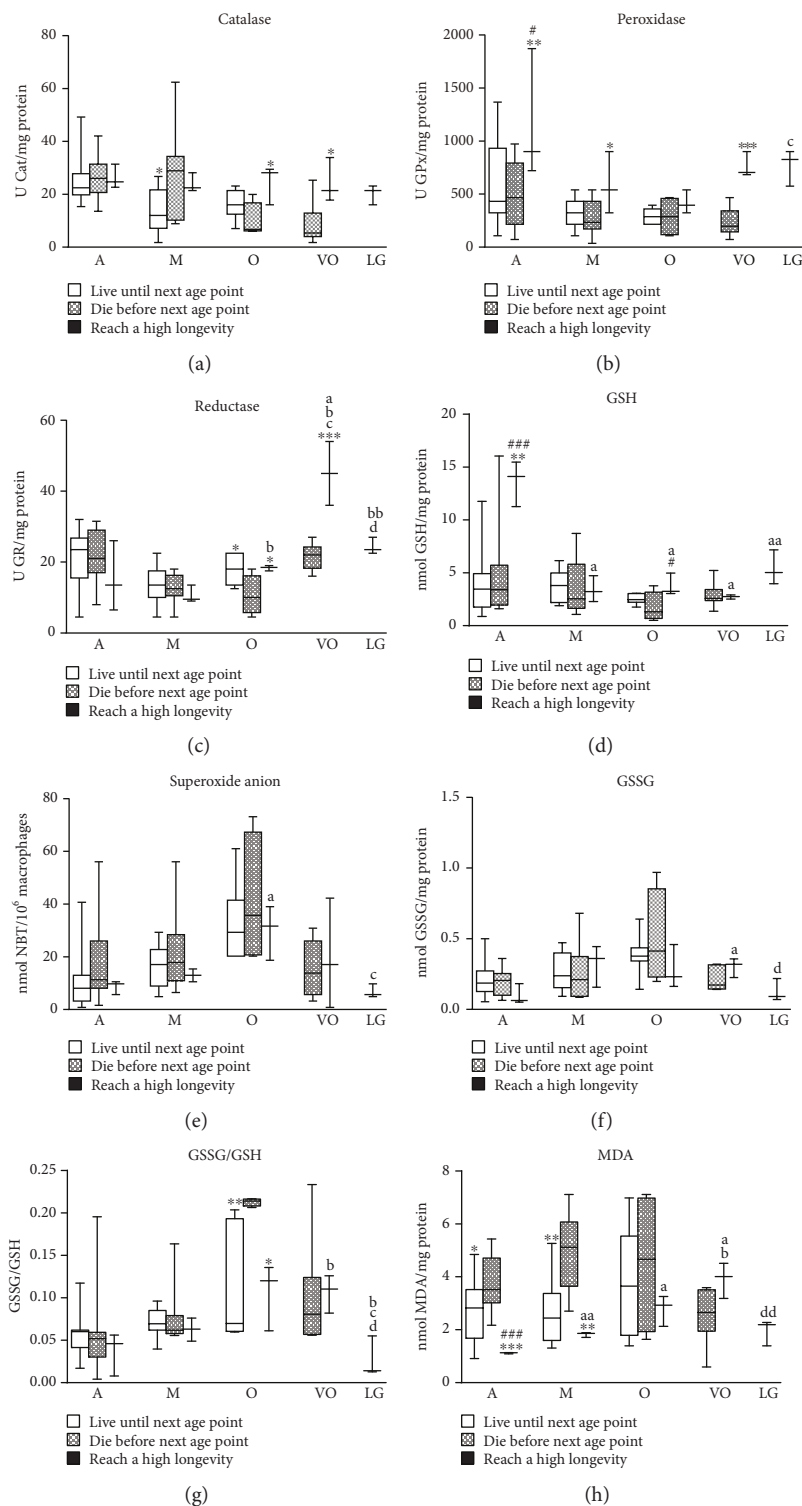


FIGURE 2: Redox parameters analysed in peritoneal leukocytes from mice throughout a longitudinal study: (a) catalase (Cat) activity; (b) glutathione peroxidase (GPx) activity; (c) glutathione reductase (GR) activities; (d) reduced glutathione (GSH) concentration; (e) superoxide anion concentration; (f) oxidized glutathione (GSSG) concentration; (g) GSSG/GSH ratio; (h) MDA concentration. A: adult mice (40 weeks old; $n = 38$); M: mature mice (56 weeks old; $n = 25$); O: old mice (72 weeks old; $n = 18$); VO: very old mice (96 weeks old; $n = 11$); LG: long-lived mice (120 weeks old; $n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with respect to the group of mice that die before the next age point (Student's t -test for independent samples). a: $P < 0.05$, aa: $P < 0.01$ with respect to adult mice that reach high longevity; b: $P < 0.05$, bb: $P < 0.01$ with respect to mature mice that reach high longevity; c: $P < 0.05$ with respect to old mice that reach high longevity; d: $P < 0.05$, dd: $P < 0.01$ with respect to very old mice that reach high longevity (Student's t -test for paired samples).

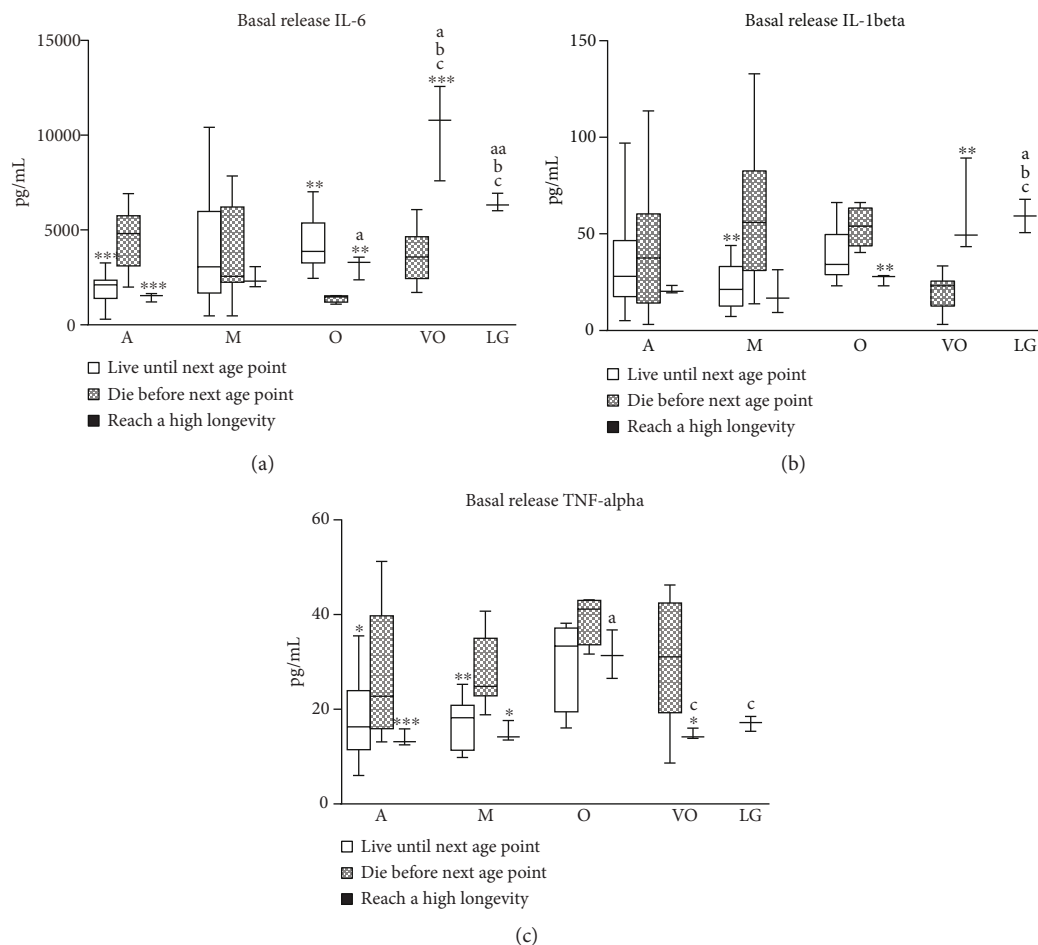


FIGURE 3: Basal release of cytokines in peritoneal leukocytes from mice throughout a longitudinal study: (a) IL-6 concentration (pg/mL); (b) IL-1 β concentration (pg/mL); (c) TNF- α concentration (pg/mL); (d) IL-10 concentration (pg/mL). A: adult mice (40 weeks old; $n = 38$); M: mature mice (56 weeks old; $n = 25$); O: old mice (72 weeks old; $n = 18$); VO: very old mice (96 weeks old; $n = 11$); LG: long-lived mice (120 weeks old; $n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with respect to the group of mice that die before the next age point (Student's t -test for independent samples). a: $P < 0.05$, aa: $P < 0.01$ with respect to adult mice that reach high longevity; b: $P < 0.05$ with respect to mature mice that reach high longevity; c: $P < 0.05$ with respect to old mice that reach high longevity (Student's t -test for paired samples).

concentrations than those that die. Long-lived mice experience an increase in almost all oxidant parameters when they are old and very old, followed by a subsequent decrease, and thus showing optimal levels when they are long-lived.

Regarding inflammatory mediators (Figure 3), both the groups of mice that survive to the next age and those that reach high longevity show, at most of the ages studied, lower basal release of proinflammatory cytokines and higher release of the anti-inflammatory cytokine IL-10, compared to those that die. Those mice that become long-lived experience a gradual increase in IL-6, IL-1 β , and TNF- α when they age, but they lessen TNF- α basal release when they are long-lived. In the same way, they experience a slight decrease in IL-10 basal release when they age, followed by a large increase when they are long-lived.

Due to the observed heterogeneity of values for a given parameter among mice from the same age group and given that the lifespan of each mouse was monitored individually, it was possible to investigate the relationship between the

values of a given parameter of each mouse at a certain age and its final achieved lifespan.

With respect to immune function parameters (Figure 4), a positive correlation was found between the chemotaxis capacity of macrophages and lifespan at the adult, mature, old, and very old ages ($P < 0.01$; $P < 0.01$; $P < 0.05$; and $P < 0.01$, respectively) and between the phagocytic ability of macrophages and achieved lifespan at the adult and very old ages ($P < 0.01$; $P < 0.05$, respectively). In addition, positive correlations were also found between the NK activity and remaining lifespan at the very old age ($P < 0.05$), between the chemotaxis capacity of lymphocytes and lifespan at the adult age ($P < 0.01$), and between the ability of lymphocytes to proliferate in response to Con A and achieved lifespan at the adult and mature ages ($P < 0.01$; $P < 0.05$, respectively).

Regarding redox parameters (Figure 5), there are positive correlations between Cat and GR activities and lifespan at the very old age ($P < 0.05$; $P < 0.01$, respectively) and between

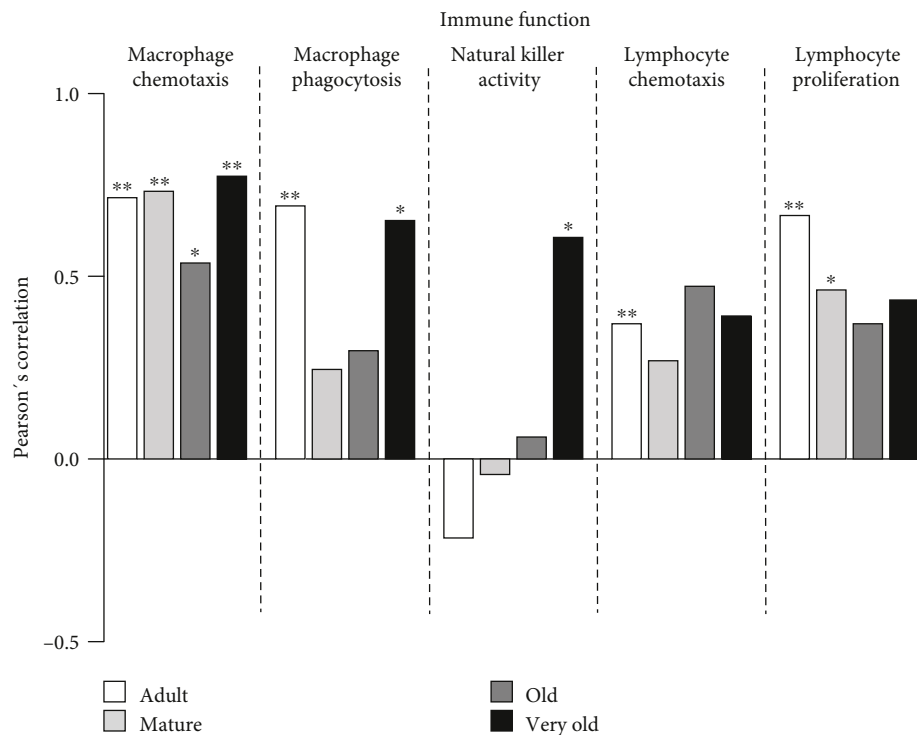


FIGURE 4: Pearson's correlation coefficient for each immune function parameter and lifespan at each age. Adult mice: 40 weeks old. Mature mice: 56 weeks old. Old mice: 72 weeks old. Very old mice: 96 weeks old. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

GPx activity and lifespan at the adult, mature, and very old ages ($P < 0.05$; $P < 0.05$; and $P < 0.01$, respectively). In addition, a positive correlation was found between GSH concentration and lifespan at the adult and old ages ($P < 0.01$), whereas a negative correlation was found between MDA concentration and lifespan at the adult and mature ages ($P < 0.01$).

With respect to the inflammatory mediators (Figure 6), there is a negative correlation between basal release of IL-6 and lifespan at the adult age ($P < 0.01$) and a positive correlation between basal release of IL-6 and lifespan at the very old age ($P < 0.05$). Likewise, a negative correlation was found between IL-1 β and lifespan at the mature age ($P < 0.05$) whereas a positive correlation was found between IL-1 β and lifespan at the very old age ($P < 0.05$). For TNF- α , there is a negative correlation between its basal release and achieved lifespan at the adult, mature, and very old ages ($P < 0.05$; $P < 0.01$; and $P < 0.05$, respectively), whereas for IL-10 there is a positive correlation with lifespan at the adult, old, and very old ages ($P < 0.01$).

4. Discussion

Biomarkers of aging are defined by their quality of predicting life expectancy, but given that life expectancy data for many individuals are difficult to collect, most of the studies establish "biomarkers of age" instead of biomarkers of aging. The "biomarkers of age" concept is simply based on cross-sectional trends of features as a function of time. According to [13], "the regular and progressive changes over time

per se do not constitute aging unless they produce some deleterious outcome." Thus, using longitudinal evidence, biomarkers of age can be validated as biomarkers of aging if high or low values are associated with deleterious or beneficial effects [14, 15]. The present longitudinal study shows that several function, redox, and inflammatory parameters of immune cells are strongly related to lifespan. Nevertheless, the most outstanding contribution is that this relationship with lifespan is different for each parameter depending on the age of the subject. Thus, our results show that certain parameters, such as the ability to proliferate and migrate towards a stimulus of lymphocytes, the capacity to migrate and ingest foreign particles of macrophages, the GPx activity, concentration of GSH and MDA as well as the basal release of IL-6, TNF- α and IL-10, strongly correlate with the final achieved lifespan of each individual mouse at the adult age. The early power of these parameters in forecasting lifespan highlights their essential role for the maintenance of health throughout aging, and therefore, they could be used as biomarkers of the rate of aging, i.e., of biological age. In addition, some of these parameters, such as macrophage chemotaxis and phagocytosis, GPx activity and basal release of TNF- α and IL-10, are also predictive of lifespan at very old age, and thus, they could be investigated in old animals in order to discriminate which will reach extreme longevity. The fact that macrophage function relates to lifespan across lifetime supports the hypothesis of phagocytes being the main cells responsible for the chronic oxidative and inflammatory stress associated with immunosenescence and therefore responsible for the rate of aging of a subject [6, 16, 17].

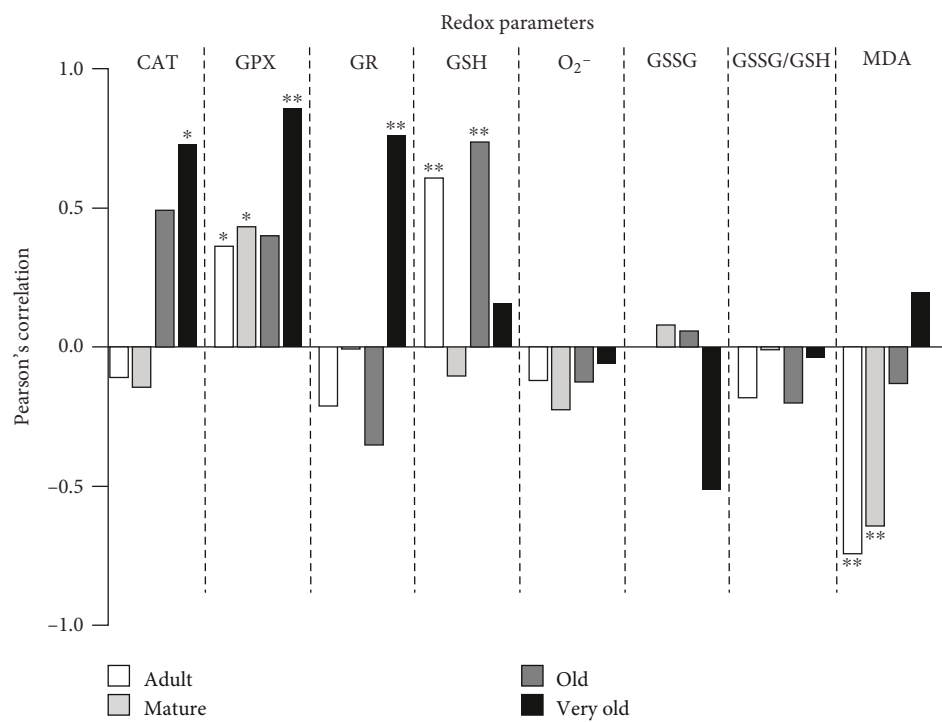


FIGURE 5: Pearson's correlation coefficient for each redox parameter and lifespan at each age. Adult mice: 40 weeks old. Mature mice: 56 weeks old. Old mice: 72 weeks old. Very old mice: 96 weeks old. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

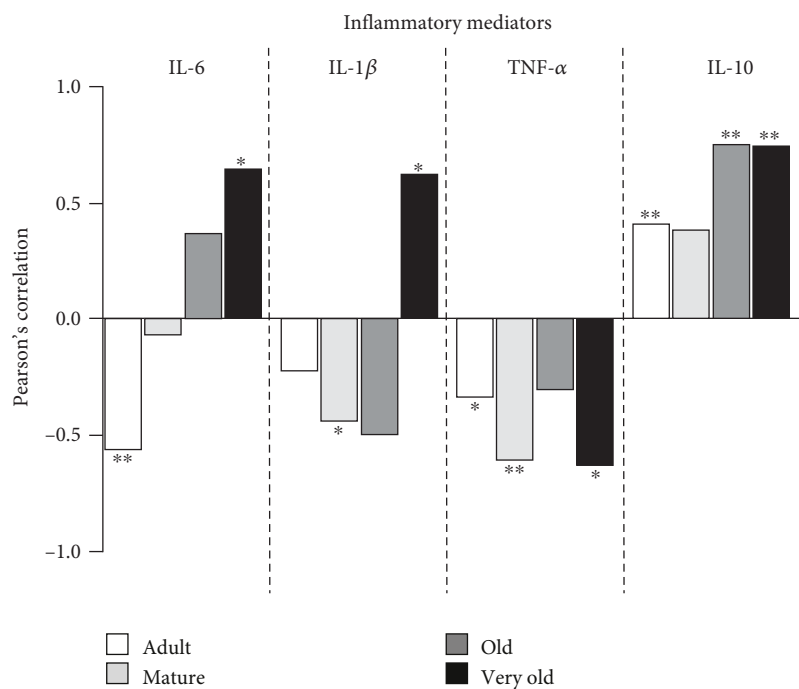


FIGURE 6: Pearson's correlation coefficient for each cytokine basal release and lifespan at each age. Adult mice: 40 weeks old. Mature mice: 56 weeks old. Old mice: 72 weeks old. Very old mice: 96 weeks old. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

In addition, the strong relation to lifespan of GPx activity during aging could be due to its ability to disarm hydrogen peroxide, limiting its harmful effects and therefore playing a critical role against oxidative stress establishment. It could

also be related to its ability to inhibit degradation of the inhibitory subunit α of nuclear factor-kappa b (NF- κ B) [18], and thus, decreasing NF- κ B activation, this enzyme could counteract inflammatory stress. In fact, in a previous

study, it was demonstrated that those mice which reach high longevity had a low level of basal NF- κ B activation [19]. In accordance with that, it was found in the present study that the lower the release of the proinflammatory TNF- α and the higher the release of the anti-inflammatory IL-10 during aging, the greater the chance of achieving higher longevity. These results agree with a previous study in which a low basal release of TNF- α and a high release of IL-10 were reported in extremely long-lived mice [20] and with another one in which the IL-10/TNF- α ratio was proposed as a marker of longevity in mice [21].

Furthermore, another striking finding of our study is that there are some parameters which were not associated with longevity at the adult age, but they become strong discriminant parameters for reaching extreme longevity at the very old age. This is the case for the natural killer (NK) cytotoxic activity and CAT and GR activities as well as the basal release of IL-6 and IL-1 β . This fact probably indicates that these markers reflect some underlying mechanisms, which are needed to reach high longevity. With respect to NK cytotoxicity and antioxidant CAT and GR activities, there seems to be a “biological purpose.” The higher the NK cytotoxic activity against tumor cells and the higher the decomposition of ROS at very old age, the higher the possibility of becoming long-lived. However, what is the “biological purpose” of an increased IL-6 and IL-1 β release at very old age if it exacerbates the chronic inflammatory stress? One potential explanation could be that the age-related increase in proinflammatory cytokines is delayed in long-lived mice, this being the reason why they show a high release of both cytokines at very old age. Another possibility could be that these cytokines might be playing an essential role regulating and orchestrating other cells given that only those mice which are able to increase their basal release at the very old age are the ones that later on reach high longevity. Accordingly, recent studies have unravelled a new role of IL-6 in mediating the reprogramming of cells associated with senescence [22], which could reverse the age-associated silencing of important antioxidant and anti-inflammatory genes.

In addition, another intriguing discovery of the study is that certain parameters can be prolongevity or antilongevity depending on the age window studied. In the present study, the NK cytotoxicity and the CAT and GR activities as well as the basal release of IL-6 and IL-1 β were negatively associated with longevity at the adult age. However, at the very old age, their significance totally changes, the higher these parameters the higher the lifespan achieved. Thus, these parameters seem to exhibit a reverse antagonistic pleiotropy. In fact, there are some other examples of markers whose roles (early antilongevity, late prolongevity) also change during aging such as the systolic blood pressure [23–26] or body mass index [27, 28]. Therefore, these results underscore the necessity to take into account the age of the individual when investigating the predictive power of a given parameter towards longevity. Moreover, they also have important practical applications, as several strategies designed to promote longevity may be useful, useless, or

harmful depending on the age at which they are carried out, as previously suggested [14]. In agreement with the results of the present study, overexpression of mitochondrial CAT in young mice was found to be detrimental, whereas its overexpression in old mice had a positive effect [29]. Thus, it seems that ROS exhibit conventional antagonistic pleiotropy explaining why stronger antioxidant mechanisms have not evolved under natural selection of young animals in nature.

Finally, our study is the first one to show the age-associated changes, regarding function, redox and inflammatory parameters in immune cells, which a long-lived individual experiences from adulthood to death. It has been proposed that long-lived individuals have a slower or decelerated aging rate [30], maintaining optimal cell functioning through aging. Strikingly, the results from our study reveal that long-lived subjects do not maintain optimal functioning, redox, and inflammatory state of their leukocytes throughout their aging. In fact, they also experience an age-associated impairment when they are old, although slighter than the one suffered by those who do not reach these advanced ages. However, they are able to adapt and rearrange these parameters at the very old age, showing optimal levels when they are long-lived. It seems that those individuals which show more biological plasticity or adaptive homeostasis [31] by restoring or even increasing cytotoxic NK activity and macrophage functions, antioxidant enzyme activities (CAT, GPx, and GR activities), and basal release of cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-10, and TNF- α) at the very old age achieve higher longevity. The most important limitation of the work is the small sample size of mice that reached extreme longevity, and therefore, the results of the present study should be validated using a larger number of mice. In addition, the observed relationships between these parameters and longevity should also be investigated in males, given that female mice, in addition to having a longer lifespan than male mice, also display a different immunity and oxidative and inflammatory states, among other characteristics [32]. Therefore, it seems plausible that those markers that are predictive of longevity in female mice could be different to those in males. Nevertheless, although preliminary, the results of the present study provide a new perspective on the use of function, redox, and inflammatory parameters of immune cells as prognostic tools in aging research and represent a novel benchmark for future work aimed at prediction of lifespan. Moreover, given that the function and oxidative stress of immune cells have been shown to follow a similar pattern in humans and mice [11, 12], strategies that are aimed at boosting the NK cytotoxicity, macrophage functions, and antioxidant enzyme activities as well as at controlling basal cytokine release in elderly individuals could help in achieving healthy aging for the general population.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants of FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union and of UCM-Research Group.

References

- [1] D. R. Seals, J. N. Justice, and T. J. LaRocca, "Physiological geroscience: targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity," *The Journal of Physiology*, vol. 594, no. 8, pp. 2001–2024, 2016.
- [2] C. Caruso, G. Passarino, A. Puca, and G. Scapagnini, "Positive biology": the centenarian lesson," *Immunity & Ageing*, vol. 9, no. 1, 2012.
- [3] S. L. Andersen, P. Sebastiani, D. A. Dworkis, L. Feldman, and T. T. Perls, "Health span approximates life span among many supercentenarians: compression of morbidity at the approximate limit of life span," *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 67A, no. 4, pp. 395–405, 2012.
- [4] N. Pavlidis, G. Stanta, and R. A. Audisio, "Cancer prevalence and mortality in centenarians: a systematic review," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 83, no. 1, pp. 145–152, 2012.
- [5] Y. Arai, H. Inagaki, M. Takayama et al., "Physical independence and mortality at the extreme limit of life span: supercentenarians study in Japan," *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 69, no. 4, pp. 486–494, 2014.
- [6] M. Fuente and J. Miquel, "An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 26, pp. 3003–3026, 2009.
- [7] D. Harman, "Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry," *Journal of Gerontology*, vol. 11, no. 3, pp. 298–300, 1956.
- [8] G. Barja, "Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no. 9, pp. 1167–1172, 2002.
- [9] C. Franceschi, M. Bonafé, S. Valensin et al., "Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 908, no. 1, pp. 244–254, 2000.
- [10] P. Alonso-Fernández, M. Puerto, I. Maté, J. M. Ribera, and M. de la Fuente, "Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 56, no. 12, pp. 2244–2251, 2008.
- [11] I. Martínez de Toda, I. Maté, C. Vida, J. Cruces, and M. De la Fuente, "Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity," *Aging*, vol. 8, no. 11, pp. 3110–3119, 2016.
- [12] I. Martínez de Toda, C. Vida, A. Garrido, and M. De la Fuente, "Redox Parameters as Markers of the Rate of Aging and Predictors of Life Span," *The Journals of Gerontology: Series A*, 2019.
- [13] L. A. Gavrilov and N. S. Gavrilova, "Reliability theory of aging and longevity," in *Handbook of the Biology of Aging*, E. J. Masoro and S. N. Austad, Eds., pp. 3–42, Academic Press, Waltham, 2006.
- [14] M. Moeller, M. Hirose, S. Mueller et al., "Inbred mouse strains reveal biomarkers that are pro-longevity, antilongevity or role switching," *Aging Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 729–738, 2014.
- [15] I. M. de Toda, A. Garrido, C. Vida, M. C. Gomez-Cabrera, J. Viña, and M. De la Fuente, "Frailty quantified by the "Valencia Score" as a potential predictor of lifespan in mice," *The Journals of Gerontology: Series A*, vol. 73, no. 10, pp. 1323–1329, 2018.
- [16] C. Vida, I. M. de Toda, J. Cruces, A. Garrido, M. Gonzalez-Sanchez, and M. De la Fuente, "Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice," *Redox Biology*, vol. 12, pp. 423–437, 2017.
- [17] C. Vida, I. Martínez de Toda, A. Garrido, E. Carro, J. A. Molina, and M. de la Fuente, "Impairment of several immune functions and redox state in blood cells of Alzheimer's disease patients. Relevant role of neutrophils in oxidative stress," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. 1974, 2018.
- [18] S. Li, T. Yan, J. Q. Yang, T. D. Oberley, and L. W. Oberley, "The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase," *Cancer Research*, vol. 60, no. 14, pp. 3927–3939, 2000.
- [19] L. Arranz, J. H. Caamaño, J. M. Lord, and M. De la Fuente, "Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor kappa B," *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 65A, no. 9, pp. 941–950, 2010.
- [20] L. Arranz, J. M. Lord, and M. De la Fuente, "Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice," *Age*, vol. 32, no. 4, pp. 451–466, 2010.
- [21] I. Martínez de Toda, C. Vida, and M. De la Fuente, "An Appropriate Modulation of Lymphoproliferative Response and Cytokine Release as Possible Contributors to Longevity," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 7, p. 1598, 2017.
- [22] A. Chiche, I. le Roux, M. von Joest et al., "Injury-induced senescence enables in vivo reprogramming in skeletal muscle," *Cell Stem Cell*, vol. 20, no. 3, pp. 407–414.e4, 2017.
- [23] C. Borghi, A. Dormi, G. L'Italien et al., "The relationship between systolic blood pressure and cardiovascular risk – results of the Brisighella Heart Study," *The Journal of Clinical Hypertension*, vol. 5, no. 1, pp. 47–52, 2003.
- [24] F. Paultre and L. Mosca, "The relation of blood pressure to coronary heart mortality in different age groups varies by ethnicity," *American Journal of Hypertension*, vol. 19, no. 2, pp. 179–183, 2006.
- [25] J. W. Blom, W. de Ruijter, J. C. M. Witteman et al., "Changing prediction of mortality by systolic blood pressure with increasing age: the Rotterdam study," *Age*, vol. 35, no. 2, pp. 431–438, 2013.
- [26] R. K. E. Poortvliet, W. de Ruijter, A. J. M. de Craen et al., "Blood pressure trends and mortality," *Journal of Hypertension*, vol. 31, no. 1, pp. 63–70, 2013.
- [27] T. W. Auyeung, J. S. W. Lee, J. Leung, T. Kwok, P. C. Leung, and J. Woo, "Survival in Older Men May Benefit From Being

Slightly Overweight and Centrally Obese—A 5-Year Follow-up Study in 4,000 Older Adults Using DXA,” *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 65A, no. 1, pp. 99–104, 2010.

- [28] K. M. Flegal, B. K. Kit, H. Orpana, and B. I. Graubard, “Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis,” *JAMA*, vol. 309, no. 1, pp. 71–82, 2013.
- [29] N. Basisty, D. F. Dai, A. Gagnidze et al., “Mitochondrial-targeted catalase is good for the old mouse proteome, but not for the young: “reverse” antagonistic pleiotropy?,” *Aging Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 634–645, 2016.
- [30] C. Franceschi, P. Garagnani, C. Morsiani et al., “The continuum of aging and age-related diseases: common mechanisms but different rates,” *Frontiers in Medicine*, vol. 5, p. 61, 2018.
- [31] L. C. D. Pomatto and K. J. A. Davies, “The role of declining adaptive homeostasis in ageing,” *The Journal of physiology*, vol. 595, no. 24, pp. 7275–7309, 2017.
- [32] S. Fischinger, C. M. Boudreau, A. L. Butler, H. Streeck, and G. Alter, “Sex differences in vaccine-induced humoral immunity,” *Seminars in Immunopathology*, vol. 41, no. 2, pp. 239–249, 2019.

ARTÍCULO 6

Manuscript number	MAD_2019_80
Title	When will my mouse die? Life span prediction based on immune function, redox and behavioural parameters at the adult age
Article type	Research Paper

Abstract

The identification of predictive markers of life span would help to unravel the underlying mechanisms influencing ageing and longevity. For this aim, 30 variables including immune functions, inflammatory-oxidative stress state and behavioral characteristics were investigated in ICR-CD1 female mice at the adult age (n=38). Mice were monitored individually until they died and individual life spans were recorded. Multiple linear regression was carried out to construct an Immunity model (adjusted R²=75.8%) comprising Macrophage chemotaxis and phagocytosis and Lymphoproliferation capacity, a Redox model (adjusted R²=84.4%) involving Reduced Glutathione and Malondialdehyde concentrations and Glutathione Peroxidase activity and a Behavioral model (adjusted R²=79.8%) comprising Internal Locomotion and Time spent in open arms indices. In addition, a Combined model (adjusted R²=88.7%) combining the six predictor variables selected in the Immune and Redox models was also constructed. The models were also cross-validated using two different sets of female mice (n=30; n=40). Correlation between predicted and observed life span was 0.849 (P<0.000) for the Immunity model, 0.691 (P<0.000) for the Redox, 0.662 (P<0.000) for the Behavioral and 0.840 (P<0.000) for the Combined one. Thus, these results provide a new perspective on the use of immune function, redox and behavioral markers as prognostic tools in ageing research.

Keywords	life span prediction; multiple linear regression; immune function; oxidative stress; anxiety-like behaviour.
Corresponding Author	Monica De la Fuente
Corresponding Author's Institution	Complutense University of Madrid
Order of Authors	Irene Martinez de Toda, Carmen Vida, Luis Sanz San Miguel, Monica De la Fuente
Suggested reviewers	Lydia Gimenez-Llort, Janet Lord, Tamas Fulop, Reinald Pamplona, Moises Bauer

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter MAAD.docx [Cover Letter]

Highlights Mech Ageing and Develop.docx [Highlights]

Abstract MAAD.docx [Abstract]

Boceto artículo 22 FINAL MAAD.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request

When will my mouse die? Life span prediction based on immune function, redox and behavioural parameters at the adult age

Irene Martínez de Toda^{1,2}, Carmen Vida^{1,2}, Luis Sanz San Miguel³, Mónica De la Fuente^{1,2}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

²Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain

³Department of Statistics and Operational Research. Faculty of Mathematics, Complutense University, Madrid, Spain

Address correspondence to: Mónica De la Fuente, PhD, MD, Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mondela@bio.ucm.es

Abstract

The identification of predictive markers of life span would help to unravel the underlying mechanisms influencing ageing and longevity. For this aim, 30 variables including immune functions, inflammatory-oxidative stress state and behavioral characteristics were investigated in ICR-CD1 female mice at the adult age (n=38). Mice were monitored individually until they died and individual life spans were recorded. Multiple linear regression was carried out to construct an Immunity model (adjusted $R^2=75.8\%$) comprising Macrophage chemotaxis and phagocytosis and Lymphoproliferation capacity, a Redox model (adjusted $R^2=84.4\%$) involving Reduced Glutathione and Malondialdehyde concentrations and Glutathione Peroxidase activity and a Behavioral model (adjusted $R^2=79.8\%$) comprising Internal Locomotion and Time spent in open arms indices. In addition, a Combined model (adjusted $R^2=88.7\%$) combining the six predictor variables selected in the Immune and Redox models was also constructed. The models were also cross-validated using two different sets of female mice (n=30; n=40). Correlation between predicted and observed life span was 0.849 ($P<0.000$) for the Immunity model, 0.691 ($P<0.000$) for the Redox, 0.662 ($P<0.000$) for the Behavioral and 0.840 ($P<0.000$) for the Combined one. Thus, these results provide a new perspective on the use of immune function, redox and behavioral markers as prognostic tools in ageing research.

Keywords: life span prediction, multiple linear regression, immune function, oxidative stress, anxiety-like behaviour.

Introduction

It is known that the pace of ageing and the expected life span varies among individuals of the same chronological age (Collier and Coleman, 1991). Individual trajectories of ageing depend on the genetic background, the environment and on interactions at the epigenetic level. As a consequence, the biological age is in part dissociated from the chronological age of an organism (Finkel et al. 1995). Construction of models for life span prediction is a fundamental challenge in ageing research given that it would provide a useful tool to study the effect that a given intervention has on the ageing rate of a subject, in less than his/her lifetime. Since life expectancy data are difficult to collect in humans due to their long life span, mice, which have a

mean longevity of around two years, are more suitable for developing such models. In addition, the identification of markers that predict life span would help to disentangle the factors influencing ageing and longevity (Swindell et al. 2008). However, the question that remains is what type of parameters should be used for life span prediction. In mice, previous studies have identified early and mid-life markers that correlate with life span (such as low body weight, T-cell subsets, serum hormone levels, cataract scores...) and models for life span prediction have been constructed (Miller, 2001; Miller et al. 2002; Harper et al. 2003; Anisimov et al. 2004; Harper et al. 2004). However, most of them have been focused on phenotypic traits that are more the result than the cause of the ageing process.

Many theories have been proposed to explain ageing. Out of all of them, the oxidative-inflammatory theory of ageing (De La Fuente and Miquel, 2009) links the age-related increase in oxidative stress (Harman, 1956; Barja, 2002) with the chronic low-grade inflammation, so-called “inflamm-ageing” (Franceschi et al. 2000), through the interplay of the immune system. Thus, the age-related increase in oxidative stress experienced by immune cells, impairs their adequate functioning and results in an increased release of pro-inflammatory mediators. Given that oxidation and inflammation are interlinked processes, there is a positive feedback loop between both processes resulting in the establishment of the age-related chronic oxidative and inflammatory stress situation. Accordingly, a relationship has been found between the immune function, the oxidative and inflammatory stress of immune cells and life span (De La Fuente and Miquel, 2009; Martínez de Toda et al. 2016; Martínez de Toda et al. 2017; Martínez de Toda et al. 2019). However, it is still not known which of these parameters or which combination of them could be used in the construction of a mathematical model in order to predict life span.

In the present study, we decided to focus on the adult, mid-life age for forecasting life span, which in our mice strain is 40 weeks and is equivalent to 40 years in humans. Previous studies have demonstrated that the inter-individual differences in ageing trajectories can already be quantified at the adult age both in humans (Rockwood et al. 2011; Belsky et al. 2015) and in mice (Whitehead et al. 2014; Rockwood et al. 2017; Antoch et al. 2017). In addition, the sooner an accelerated ageing rate is detected, the earlier lifestyle strategies can be implemented to slow it down.

In relation to this, several conditions have been described to cause an accelerated ageing, among them an inadequate response to stress or an anxiety-like behaviour (Perna et al. 2015; De La Fuente, 2018). Accordingly, it has been demonstrated that mice with chronic hyperreactivity to stress show a premature immunosenescence, a premature frail status and they have a shorter life span (Viveros et al. 2002; Martínez de Toda et al. 2016; Martínez de Toda et al. 2018). Several behavioural tests are used to assess anxiety levels in mice, the most used being the elevated plus maze (EPM) (Walf and Frye, 2007) and the hole-board (HB) (Brown and Nemes, 2008) tests. However, it is not known which of the behavioural indices derived from these tests, if any, can be used to forecast the life span of a given mouse. Thus, we also decided to investigate the potential predictive power of the

behavioural indices of adult mice exposed to the hole-board (HB) test and the elevated plus maze (EPM) test towards life span.

Therefore, several immune function (macrophage chemotaxis and phagocytosis, natural killer activity, lymphocyte chemotaxis and proliferation), inflammatory (basal release of IL-6, IL-1 β , TNF- α and IL-10) and redox parameters (catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase activities, reduced and oxidized glutathione, superoxide anion and malondialdehyde concentrations) as well as behavioural responses to the HB and EPM tests, were investigated in a set of 38 female mice at the adult age (40 weeks-old). Mice were monitored individually along the ageing process and individual life spans were recorded. Therefore, it was possible to construct one model based on immune functionality and inflammatory mediators, other based on redox parameters, another based on behavioural indices and a fourth one by combining redox and immune parameters using multiple linear regression (MLR). In addition, models were cross-validated in different sets of female mice. This approach, allowed us firstly to discover the parameters most implicated in longevity; secondly, to assess which cohort of parameters (if immune function, redox or behavioural) is most relevant for life span prediction and thirdly, which model has a higher reproducibility by verifying their predictive power in different sets of female mice.

Material and methods

Experimental animals and extraction of peritoneal leukocytes. 40 female outbred ICR/CD-1 ex-reproductive mice (*Mus musculus*) were acquired from Janvier Labs (Germany) when they were 32 \pm 4 weeks old. Behavioral tests described below and collection of peritoneal cell suspensions were performed at the adult age of 40 \pm 4 weeks; following a previous described method (Martínez de Toda et al. 2016). The measurement of markers was performed using unfractionated peritoneal leukocytes to better reproduce the *in vivo* situation. Animals were monitored individually along the ageing process and each individual achieved life span was recorded. Life span varied from 45 to 136 weeks. Mean life span was 74 \pm 4 weeks. Another set of mice (30 outbred ICR/CD-1 ex-reproductive female mice) was used for validation of the Immunity and Redox model. Same immune and redox parameters were measured at the adult age of 40 \pm 4 weeks and individual life span monitored. In this set of mice life span varied from 50 to 128 weeks. Mean life span was 93 \pm 3 weeks. Another set of mice (40 outbred ICR/CD-1 ex-reproductive female mice) was used for

validation of the Behavioural model. Same behavioural indices were also measured at the adult age of 40 ± 4 weeks and individual life span monitored. In this set of mice life span varied from 40 to 130 weeks. Mean life span was 81 ± 4 weeks. Female mice were used for this study because male mice show aggressive and dominant behaviour when caged together and it has been shown that social isolation causes alterations in the neuroimmunoendocrine communication (Cruces et al. 2014).

Analysis of immune function and inflammatory parameters

Chemotaxis. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 cells (macrophages or lymphocytes)/ml in Hank's medium and placed into a Boyden chamber. The number of cells that migrated towards formyl-Met-Leu-Phe were counted and expressed as Chemotaxis Index, as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Phagocytosis. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 macrophages/ml in Hank's medium and placed into migration inhibition factor (MIF) plates for 30 min. After washing, latex beads were added into the plates and the number of latex beads phagocytosed by 100 macrophages were counted and expressed as Phagocytic Index, as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Natural killer cytotoxicity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/ml in RPMI 1640 medium and placed into 96-well plates. Murine YAC-1 lymphoma cells were added into wells and Natural killer activity was assessed by quantifying released lactate dehydrogenase into the medium (Cytotox 96 TM Promega, Germany). The results were expressed as the percentage of tumor cells killed (% lysis), as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Lymphoproliferative capacity. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 cells lymphocytes/ml in RPMI 1640 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) and placed into 96-well plates. The mitogen concanavaline A (Con A) or complete medium were added into wells and incubated for 48h. Then ^3H -thymidine was also added and incubated for 24h. ^3H -thymidine uptake was quantified in a beta counter both in basal and stimulated conditions and results are expressed as lymphoproliferation capacity (%) being 100% the counts per minute (cpm) in basal conditions, as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Cytokine measurement. After incubation of peritoneal immune cells during 48 hours in the absence of any mitogen (basal conditions), supernatants were collected. Basal release of IL- 1β , IL-6, TNF- α and IL-10 was measured simultaneously in those supernatants by multiplex luminometry (Beadlyte mouse multiplex cytokine detection system, MHYSTOMAG-70K, Upstate, Millipore).

Determination of oxidative stress parameters

Catalase activity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/ml in Hank's medium, centrifuged and cell pellets resuspended in oxygen-free phosphate buffer 50 mM. Then, they were sonicated and supernatants were used for the enzymatic reaction together with 14mM H_2O_2 as substrate. Decomposition of H_2O_2 was measured at 240 nm as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). The results were expressed as units (U) of catalase activity/mg protein.

Glutathione peroxidase activity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/ml in Hank's medium, centrifuged and cell pellets resuspended in oxygen-free phosphate buffer 50 mM. Then, they were sonicated and supernatants were used for the enzymatic reaction together with cumene hydroperoxide as a substrate (cumene-OOH) as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). Oxidation of NADPH was measured at 340 nm. The results were expressed as units (U) of glutathione peroxidase activity/mg protein.

Glutathione reductase activity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/ml in Hank's medium, centrifuged and cell pellets resuspended in oxygen-free phosphate buffer 50 mM EDTA 6.3 mM. Then, they were sonicated and supernatants were used for the enzymatic reaction together with GSSG 80 mM as substrate. Oxidation of NADPH was measured at 340 nm, as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). The results were expressed as units (U) of glutathione reductase activity/mg protein.

Glutathione concentration. Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/ml in Hank's medium, centrifuged and cell pellets resuspended in phosphate buffer 50 mM EDTA 0.1M pH 8. Then, they were sonicated and supernatants were used for the quantification of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione by the reaction capacity that GSSG and GSH have with o-phthalaldehyde (OPT) at pH 12 and pH 8, respectively, resulting in the formation of a fluorescent compound. Fluorescence was measured at 350 nm excitation and 420 nm emission, as previously described (Martínez de

[Toda et al. 2019](#)). Results were expressed as nmol of GSSG and GSH per milligram of protein. Moreover, the GSSG/GSH ratio was calculated for each sample.

Intracellular superoxide anion concentration.

Cell suspensions were adjusted to 10^6 macrophages/ml in Hank's medium and mixed with NBT (1mg/ml). After 60 min incubation the reaction was stopped with HCl 0.5M, samples were centrifuged and supernatants discarded. Intracellularly reduced NBT was extracted with dioxan and absorbance was measured at 525 nm, as previously described ([Martínez de Toda et al. 2019](#)). Results were expressed as nmol superoxide anion/ 10^6 macrophages.

Malondialdehyde concentration.

Determination of malondialdehyde (MDA) concentration was evaluated using the commercial kit "Lipid peroxidation (MDA) Assay Kit" (Biovision, CA, USA). Cell suspensions were adjusted to 10^6 total cells/ml in Hank's medium, centrifuged and cell pellets resuspended in MDA lysis buffer containing BHT. Then, they were sonicated and supernatants were incubated with thiobarbituric acid (TBA) for 60 min in a water bath at 95°C. Then, samples were centrifuged, supernatants collected and dispensed into 96-well plates for spectrophotometric measurement at 532 nm, as previously described ([Martínez de Toda et al. 2019](#)). Results were expressed as nmol MDA/mg protein.

Exploratory and anxiety-like behavioural tests

Holeboard test. Behaviour of the mouse was recorded for 5 min and the calculated behavioural indices were: total locomotion (total number of squares that the animal crosses), internal locomotion (total number of internal squares that the animal crosses), external locomotion (total number of external squares that the animal crosses), percentage of internal locomotion (total number of internal squares that the animal crosses divided by total locomotion), percentage of external locomotion (total number of external squares that the animal crosses divided by total locomotion). All these parameters reflect the horizontal activity of the animal. For vertical activity parameters, total number of rearing and

time (in seconds) of each rearing were analysed. Furthermore, the total number of head-dipping and the time (in seconds) of each head-dipping were evaluated as "goal-directed behaviour". Finally, grooming and freezing behaviours (number and duration, in seconds) were also recorded.

Elevated plus maze. Mice were individually placed on the central platform facing an enclosed arm and were allowed to freely explore the maze for 5 min. Calculated parameters were: time spent in open arms, time spent in closed arms, time spent in central platform, number of entries (four paws criteria) in open arms, closed arms and central platform. The total number of grooming was also recorded.

Statistical Analysis. The power to predict remaining life span of immune, redox and behavioural parameters recorded at 40 weeks of age was investigated by multiple linear regression (MLR). Recorded life span was used as a dependent variable and all other variables were used as predictor variables. The step-wise forward method procedure for generation of the model was chosen. It first selects the predictor variable that explains the dependent variable the most, then the next one and so on. The threshold criteria for variable selection into the model construction was $P < 0.05$. Generation of models was performed using SPSS 21.0 and Statgraphics Centurion XVIII. Four models were generated, one for immune function and inflammatory parameters called "the Immunity model", another one for redox parameters called "the Redox model", a third one based on behavioural indices called "the Behavioural model" and a "Combined model" including both immune and redox variables. For each adjusted model, the normality of residuals, the constant variability of residuals (homoscedasticity) and the independence of residuals were checked, in order to verify the Gauss-Markov hypothesis, through the corresponding graphic and analytical analysis. In addition, for validation and cross-validation of the models, Pearson's correlation coefficients were calculated between the observed and predicted life span in different sets of female mice.

Results

All the investigated parameters were grouped into three sets, the first one including immune function and inflammatory mediators, the second one involving redox parameters and the third one comprising behavioural parameters (**Table 1**). Then, multiple linear regression was performed separately on each of the three sets of parameters, designating life span as a dependant variable and the respective parameters as predictor variables. Model construction was carried out by using the step-wise forward approach for variable selection. We will refer to the Immunity model as the one based on immune function and inflammatory parameters; to the Redox model as

the one based on antioxidant and oxidant parameters and to the Behavioural model to the one based on the behavioural indices.

Model construction of the Immunity model is shown in **Table 2**. The first variable selected (macrophage chemotaxis) accounts for almost 50% of the variance in life span. When introducing the second one (macrophage phagocytosis) the explained variance increased up to almost 70%, and when the third one was added (lymphoproliferation capacity) the explained variance increased to 76%.

Immune function and inflammatory parameters	Redox parameters	Behavioral parameters	
Natural Killer activity	Catalase activity	Elevated plus maze (EPM) test	Time in open arms
Macrophage chemotaxis	Glutathione peroxidase activity		Entries in open arms
Macrophage phagocytosis	Glutathione reductase activity		Time in closed arms
Lymphocyte chemotaxis	Reduced glutathione (GSH)		Entries in closed arms
Lymphoproliferation capacity	Xanthina oxidase activity		Time in the central platform
Basal release of IL-10	Anion superoxide concentration		Entries in the central platform
Basal release of IL-1 β	Malondialdehyde concentration		
Basal release of IL-6	Oxidized glutathione (GSSG)		
Basal release of TNF- α	Ratio GSSG/GSH	Hole board (HB) test	Total, internal and external locomotion
			Percentage of internal and external locomotion/total
			Number and time of "rearings"
			Number and time of "groomings"
			Number and time of "head-dipping"
			Number and time of "freezing"

Table 1. Set of variables used for model construction.

	Model 1	Model 2	Model 3
Constant ($\hat{\beta}_0$)	22.023 (8.963)	1.171 (8.143)	-0.071 (7.295)
Macrophage chemotaxis ($\hat{\beta}_1$)	0.094 *** (0.015)	0.069 *** (0.013)	0.055 *** (0.012)
Macrophage phagocytosis ($\hat{\beta}_2$)		0.049 *** (0.010)	0.040 *** (0.009)
Lymphoproliferation ($\hat{\beta}_3$)			0.068 ** (0.022)
R²	51.3%	71.3%	77.7%
Adjusted R²	49.9%	69.7%	75.8%

Table 2. Immunity Model construction through step-wise forward method. Predicted remaining life span = $\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 \times \text{Macrophage chemotaxis} + \hat{\beta}_2 \times \text{Macrophage phagocytosis} + \hat{\beta}_3 \times \text{Lymphoproliferation}$. Each value shows the estimated coefficient and the standard error for each coefficient is shown in brackets. *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

The steps for the Redox model construction are shown in **Table 3**. The first selected variable (GSH concentration) explains 65% of the life span achieved. When introducing the next one (MDA concentration) the explained variance increased to almost 79%, and when the third one was added (glutathione peroxidase activity) the explained variance increased to 84%. The construction of the Behavioural model is shown

in **Table 4**. The first chosen variable (internal locomotion in the hole board test) accounts for 62% of the variance. When introducing the second one (time spent in open arms in the elevated plus maze test) the explained variance increased to almost 80%. A third variable was not introduced given that none of the other variables fulfilled the $P < 0.05$ criteria.

	Model 1	Model 2	Model 3
Constant ($\hat{\beta}_0$)	46.659 (4.655)	85.894 (9.530)	74.459 (8.846)
GSH ($\hat{\beta}_1$)	5.134 *** (0.681)	3.506 *** (0.645)	2.532 *** (0.624)
MDA ($\hat{\beta}_2$)		-10.224 *** (2.297)	-8.934 *** (2.004)
Glutathione Peroxidase ($\hat{\beta}_3$)			0.021 ** (0.006)
R ²	66.2%	80.2%	86.0%
Adjusted R ²	65.0%	78.8%	84.4%

Table 3. Redox Model construction through step-wise forward method. Predicted remaining life span $= \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 \times \text{GSH} + \hat{\beta}_2 \times \text{MDA} + \hat{\beta}_3 \times \text{Glutathione Peroxidase}$. Each value shows the estimated coefficient and the standard error for each coefficient is shown in brackets. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

	Model 1	Model 2
Constant ($\hat{\beta}_0$)	13.763 (8.245)	11.833 (6.001)
Internal Locomotion ($\hat{\beta}_1$)	0.554 *** (0.071)	0.378 *** (0.060)
Time spent in OA ($\hat{\beta}_2$)		0.202 *** (0.035)
R ²	62.8%	80.9%
Adjusted R ²	61.7%	79.8%

Table 4. Behavioral Model construction through step-wise forward method. Predicted remaining life span $= \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 \times \text{Internal Locomotion} + \hat{\beta}_2 \times \text{Time spent in open arms}$. Each value shows the estimated coefficient and the standard error for each coefficient is shown in brackets. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Furthermore, an additional model was built, including all the selected variables for the Immune and the Redox models. All variables included fulfilled the $P < 0.05$ criteria and the explained variance of this model was almost 89% (Table 5). In order to ascertain the individual contribution of each variable in the different adjusted models, the standardized beta values were calculated for each variable within each

model and shown in **Figure 1**. Standardization of the coefficient is usually used to answer the question about which of the independent variables have a greater effect on the dependent variable in a multiple regression analysis, when the variables are measured in different units of measurement, as it is the case of the variables used in this study.

	Combined Model
Constant ($\hat{\beta}_0$)	37.196 (10.434)
GSH ($\hat{\beta}_1$)	2.006 *** (0.518)
MDA ($\hat{\beta}_2$)	-5.150 ** (1.621)
Macrophage Phagocytosis ($\hat{\beta}_3$)	0.020 * (0.008)
GPx ($\hat{\beta}_4$)	0.013 * (0.006)
Lymphoproliferation ($\hat{\beta}_5$)	0.035 * (0.016)
Macrophage Chemotaxis ($\hat{\beta}_6$)	0.021 * (0.011)
R^2	90.5%
Adjusted R^2	88.7%

Table 5. Combined Model including the previously selected variables from the Immune and the Redox models. Predicted remaining life span = $\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 \times \text{GSH} + \hat{\beta}_2 \times \text{MDA} + \hat{\beta}_3 \times \text{Macrophage Phagocytosis} + \hat{\beta}_4 \times \text{Glutathione Peroxidase} + \hat{\beta}_5 \times \text{Lymphoproliferation} + \hat{\beta}_6 \times \text{Macrophage Chemotaxis}$. Each value shows the estimated coefficient and the standard error for each coefficient is shown in brackets. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

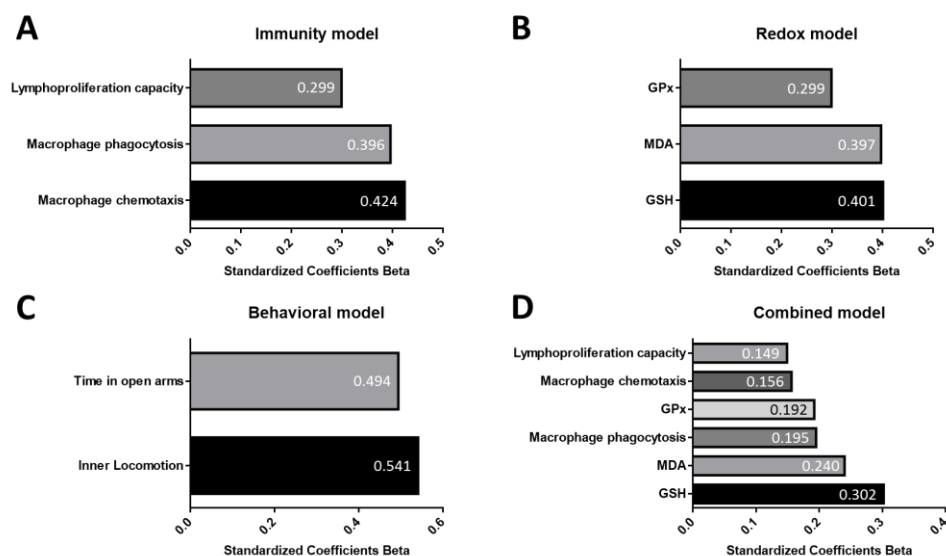


Figure 1. Relative contribution of each variable towards life span prediction in A) Immunity Model; B) Redox Model; C) Behavioral Model; D) Combined Model. The contribution of each variable is expressed as its standardized beta coefficient.

After model construction, Pearson's correlation coefficients were calculated between observed and predicted life span using the data from the mice that were used for model development (**Figure 2**). Pearson's correlation coefficient for the Immunity Model was 0.883, for the Redox Model was 0.923, for the Behavioural Model was 0.899 and for the Combined Model 0.951 ($P = 0.000000$ in all cases).

Next step was to validate their predictive power in a different set of ICR/CD-1 female mice. The Immunity, Redox and Combined models were validated in one set of 30 mice whereas the Behavioural model was validated in another set of 40 mice (**Figure 3**). For the Immunity model, Pearson's correlation coefficient obtained between predicted and observed life span was 0.849 ($P = 0.000000$), ($n=30$). For the Redox model, Pearson's correlation coefficient obtained between predicted and observed life span was 0.691 ($P = 0.000024$), ($n=30$). For the Behavioural model Pearson's correlation coefficient obtained between predicted and

observed life span was 0.662 ($P = 0.000006$), ($n=40$) and for the Combined model, Pearson's correlation coefficient between predicted and observed life span was 0.840 ($P = 0.000000$) ($n=30$).

Discussion

Models that predict individual life span can provide a valuable tool for ageing research and the development of such models represents a platform for understanding the mechanisms that influence longevity. Full-length survivorship experiments require many years to be accomplished and consequently they are a rate-limiting step in the study of mammalian ageing. Therefore, well-developed and validated predictive models can generate preliminary data years in advance, and the output of such models, as an integration of multiple variables that may predict life span individually, can provide a surrogate target for ageing research that is easier to evaluate than life span ([Swindell et al. 2008](#)).

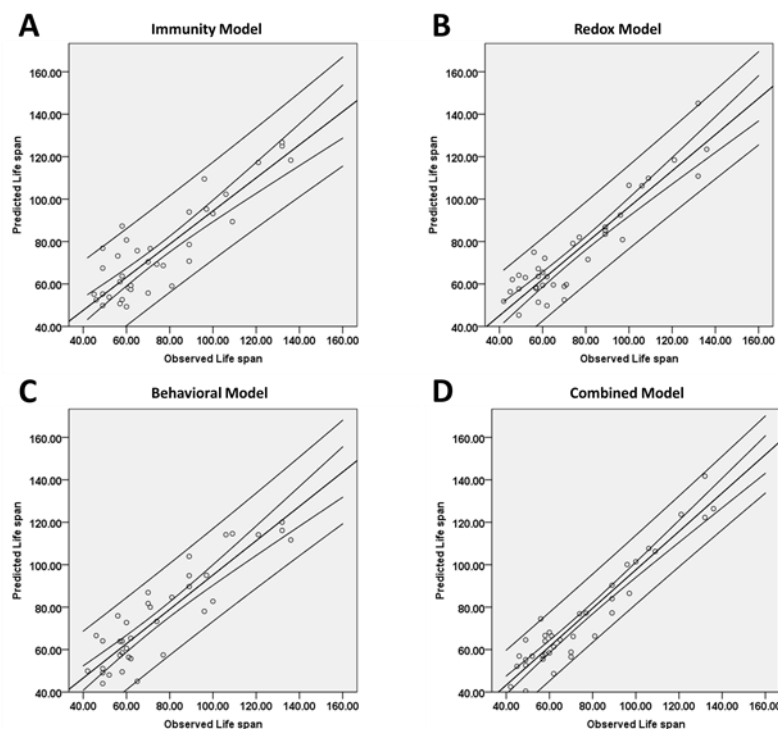


Figure 2. Validation of A) Immunity model, B) Redox model, C) Behavioral model, D) Combined model in the same set of mice used for model construction (N=38). The narrowest lines indicate the mean confidence interval and the wider lines indicate the individual confidence interval, with a 95% confidence.

In previous studies, different variables have been shown to correlate with longevity such as tight wire clinging ability, open field activity, collagen denaturation rate, hair regrowth, wound healing and blood haemoglobin concentration in certain mouse genotypes (Harrison and Archer, 1998). The most important step when developing predictive models is the variable selection criteria. Chosen variables should be known to be related to the ageing process but also should be implicated in it. Many biomarkers that are moderately correlated with age may be totally irrelevant to ageing. For example, degree of baldness increases with age especially in men, but men who grow bald early do not necessarily show signs of accelerated ageing nor is baldness a risk factor for early death (Hochschild, 1989). In the present study, we decided to focus on immune functionality, inflammatory and redox parameters of immune cells due to several reasons. First, the immune system has been proposed to be a marker and modulator of the rate of ageing (De La Fuente and Miquel, 2009; Martínez de Toda et al. 2016). Therefore, the appearance of age-related changes in those parameters at the adult age was hypothesized as influencing final achieved life span. In addition,

the age-related changes regarding functional and redox state of immune cells have been shown to follow the same pattern in both humans and mice (Martínez de Toda et al. 2016; Martínez de Toda et al. 2019), and therefore, the results would have the potential to be extrapolated to humans. In addition, anxiety-like behaviours were also evaluated at the adult age given that they have been associated with an acceleration of the ageing rate (Perna et al. 2015).

The second most important step when developing a life span predictive model is the election of an appropriate approach to do so. In the present study, the multiple linear regression method was chosen. The advantage of this approach is the strong statistical foundation of least-square regression procedures, which allows for robust statistical inferences when parametric assumptions are satisfied (Swindell et al. 2008). The main disadvantage, however, is that complex and non-linear relationships may not be adequately captured by linear regression models (Neter et al. 1996). However, for most of the variables investigated in the present study, there was a linear relationship between them and life span allowing us to choose this procedure.

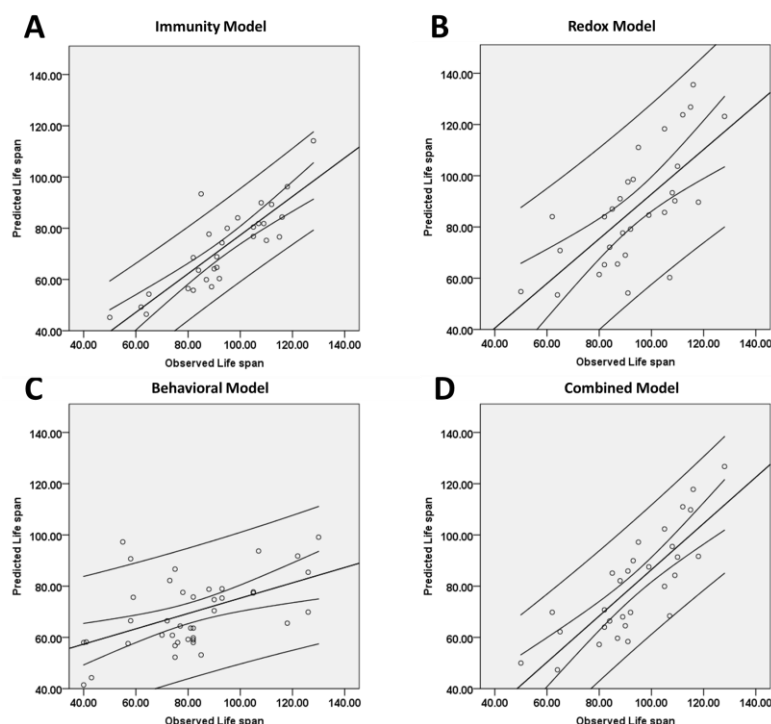


Figure 3. Cross-validation of A) Immunity model, B) Redox model and D) Combined model in another set of 30 female mice, and C) Behavioral model in a different set of 40 female mice. The narrowest lines indicate the mean confidence interval and the wider lines indicate the individual confidence interval with a 95% confidence.

In the Immunity model, the two most important variables selected were macrophage chemotaxis and phagocytosis. The fact that both macrophage functions predict almost 70% of final achieved life span agrees with the hypothesis of phagocytes being the main cell type responsible for the chronic oxidative and inflammatory stress associated with immunosenescence, and therefore, responsible for the ageing rate of a subject, as it has been previously suggested (Vida et al. 2017a; Vida et al. 2017b). Selection of the third variable, the proliferative capacity of lymphocytes, also agrees with previous studies in which this marker has been used to ascertain the Immune Risk Profile in humans, which relates to mortality (De La Rosa et al. 2006).

With respect to the Redox model, GSH and MDA concentrations were found to be predictive of almost 80% of the final achieved life span. It is known that immune cells are among the cell types in which an optimal redox balance is most critical for proper functioning, given that they need to constantly produce oxidant and pro-inflammatory compounds in order to exert their defensive function against inner and foreign insults (De La Fuente and Miquel, 2009). Thus, it is understandable to think that the higher the GSH concentration and the higher Glutathione Peroxidase activity in immune cells together with the lower one of MDA, the better the redox balance of these cells, and therefore their function. In fact, GSH has been shown to be essential for proper immune cell functioning given that even a moderate depletion of GSH has been shown to impair several leukocyte functions (Dröge and Breitkreutz, 2000). MDA, which is an end-product of reactive oxygen species (ROS)-induced peroxidation and therefore, is used as a marker of oxidative stress has also been shown to play an active role by inducing the cross-links in proteins and forming irreversible advanced glycated end-products (AGEs) (Esterbauer et al. 1990). These AGEs increase the expression of the membrane anchored receptor for AGEs and activate nuclear factor kappa B (NF- κ B) inducing the production of a variety of pro-inflammatory cytokines, including IL-6 and TNF- α (Cai et al. 2018). In addition, glutathione peroxidase activity is known to disarm hydrogen peroxide, limiting its harmful effects and therefore playing a critical role against oxidative stress establishment. However, it has also been demonstrated that it can inhibit degradation of the inhibitory subunit α of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (Li et al. 2000), thus its activity would maintain NF- κ B repressed, also playing an essential role against the establishment of a chronic inflammatory stress.

In the Behavioural model, both the variables that correlated the most with life span, explaining 80% of the variance, were inner locomotion and time spent in open arms. Because mice have a natural aversion to the brightly lit centre of an open field, exploration of the inner space in the hole board test as well as exploration of an open arm in the elevated plus maze test are indicators of an anti-anxiety like behaviour (Crawley, 2000; Kassed and Herkenham, 2004). This draws the conclusion that the less anxiety-like behaviour a mouse shows at the adult age, the longer it lives. These results agree with a previous study in which behavioural indices in old males were used for life span prediction, and the variables that positively correlated the most with remaining life span were distance in open field and number of entries in open arms (Fahlström et al. 2012).

The next step was to develop another model, which would take into account more than one dimension for life span prediction. Therefore, we decided to focus on the selected variables from the Immunity and the Redox models to construct the Combined model. These variables were prioritized over the Behavioural ones in order to develop a model with potential to be extrapolated to humans. According to this, it has been previously demonstrated that the age-related changes in immune and redox parameters follow a similar pattern in humans and mice (Martínez de Toda et al. 2016; Martínez de Toda et al. 2019). Moreover, and despite the fact that anxiety traits have also been linked to an accelerated ageing in humans (De La Fuente, 2018), the behavioural tests performed in the present study in mice cannot be directly translated to humans. Thus, the Combined model including Macrophage Phagocytosis and Chemotaxis, Lymphoproliferation capacity, GSH, MDA and GPx activity was found to explain almost 90% of the total variance.

Even though the potential value of constructed models that accurately predict life span is substantial and efforts directed towards formulating such models will advance our understanding of the factors regulating longevity, the most important step is to evaluate how accurately mouse life span is predicted when models are applied to a new set of animals which have not been used for model construction. Accordingly, the reproducibility of each of the four different models constructed (Immunity, Redox, Behavioural and Combined models) was verified using a different set of mice. This provides an assessment of model reproducibility, which is of great importance for determining the usefulness of models in practical contexts (Duda et al. 2001). Thus, the four models were shown to be useful for life span prediction in a different

set of mice and the more robust ones were the Immune and the Combined models. It is important to highlight that the mice used for the present study are outbred, which means that they are much more heterogeneous within themselves than other strains more commonly used such as C57/BL6. Therefore, and even though the proposed models should be investigated in larger samples, including males as well as in other strains, the selected variables arise as strong determinants of longevity in mice. Altogether, the results shown in here highlight the importance of an appropriate immune function and redox state of immune cells as well as a non-anxiety like behaviour for a high longevity and provide a novel benchmark for future work aimed at prediction of life span.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to report.

Funding

This work was supported by grants of FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union and of UCM-Research Group.

References

- Anisimov, VN., Arbeev, KG., Popovich, IG., Zabezhinski, MA., Arbeeva, LS., Yashin, AI. 2004. Is early life body weight a predictor of longevity and tumor risk in rats? *Exp. Gerontol.*, 39:807–816. doi: 10.1016/j.exger.2004.02.004.
- Antoch, MP., Wrobel, M., Kuropatwinski, KK., Gitlin, I., Leonova, KI., Toshkov, I., Gleiberman, AS., Hutson, AD., Chernova, OB., Gudkov, AV. 2017. Physiological frailty index (PFI): quantitative in-life estimate of individual biological age in mice. *Aging*, 9:615–626. doi:10.18632/aging.101206.
- Barja, G. 2002. Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic. Biol. Med.*, 33:1167–1172. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00910-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00910-3).
- Belsky, DW., Caspi, A., Houts, R., Cohen, HJ., Corcoran, DL., Danese, A., Harrington, H., Israel, S., Levine, ME., Schaefer, JD., Sugden, K., Williams, B., Yashin, AI., Poulton, R., Moffitt, TE. 2015. Quantification of biological aging in young adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112:E4104–E4110. doi:10.1073/pnas.1506264112.
- Brown, GR., Nemes, C. 2008. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia?. *Behav. Processes*, 78(3):442–8. DOI: 10.1016/j.beproc.2008.02.019.
- Cai, JG., Luo, LM., Tang, H., Zhou, L. 2018. Cytotoxicity of Malondialdehyde and Cytoprotective Effects of Taurine via Oxidative Stress and PGC-1 α Signal Pathway in C2C12 Cells. *Mol. Biol. (Mosk)*, 52(4): 616–627. <https://doi.org/10.1134/S0026893318040040>.
- Collier, TJ., Coleman, PD. 1991. Divergence of biological and chronological aging: evidence from rodent studies. *Neurobiol. Aging*, 12(6):685–693. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90122-Z](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90122-Z).
- Crawley, J. 2000. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Cruces, J., Venero, C., Pereda-Pérez, I., De la Fuente, M. 2014. The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr. Pharm. Des.*, 20:4608–4628. doi:10.2174/1381612820666140130205822
- De la Fuente, M., Miquel, J. 2009. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr. Pharm. Des.*, 15:3003–3026. doi: 10.2174/138161209789058110.
- De la Fuente, M. 2018. Oxidation and Inflammation in the immune and nervous systems, a link between aging and anxiety. In *Handbook of Immunosenescence*. T. Fulops et al., (eds.). Springer Nature. 28 pp.
- DelaRosa, O., Pawelec, G., Peralbo, E., Wikby, A., Mariani, E., Mocchegiani, E., Tarazona, R., Solana, R. 2006. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*, 7:471–81. doi: 10.1007/s10522-006-9062-6.
- Dröge, W., Breitkreutz, R. 2000. Glutathione and immune function. *Proc. Nutr. Soc.*, 59(4):595–600. <https://doi.org/10.1017/S0029665100000847>.
- Duda, RO., Hart, PE., Stork, DG. 2001. Pattern Classification. Vol. 2nd ed. John Wiley and Sons; New York.
- Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, J. 1990. Aldehydes formed by lipid peroxidation: Mechanisms of formation, occurrence, and determination, in *Membrane Lipid Oxidation*. Ed. C. Vigo-Pelfrey. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 239–268.

- Fahlström, A., Zeberg, H., Ulfhake, B. 2012. Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction. *Age*, 34(6):1435-52. doi: 10.1007/s11357-011-9320-7.
- Finkel, D., Whitfield, K., McGue, M. 1995. Genetic and environmental influences on functional age: a twin study. *J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci.*, 50:104–113. doi: 10.1093/geronb/50B.2.P104.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G. 2000. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 908:244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Harman, D. 1956. Ageing: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11:298- 300.
- Harper, JM., Galecki, AT., Burke, DT., Miller, RA. 2004. Body weight, hormones and T cell subsets as predictors of life span in genetically heterogeneous mice. *Mech. Age Develop.*, 125:381–390. doi: 10.1016/j.mad.2004.03.003.
- Harper, JM., Wolf, N., Galecki, AT., Pinkosky, SL., Miller, RA. 2003. Hormone levels and cataract scores as sexspecific, mid-life predictors of longevity in genetically heterogeneous mice. *Mech. Age Develop.*, 124:801–810. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(03)00133-7).
- Harrison, DE., Archer, JR. 1988. Biomarkers of aging: tissue markers. Future research needs, strategies, directions and priorities. *Exp. Gerontol.*, 23:309–321.
- Hochschild, R. 1989. Improving the precision of biological age determinations. Part 1: A new approach to calculating biological age. *Exp. Gerontol.*, 24(4):289–300. doi:10.1016/0531-5565(89)90002-8
- Kassed, CA., Herkenham, M. 2004. NF-kB p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety. *Behav. Brain Res.*, 154: 577–584. doi: 10.1016/j.bbr.2004.03.026.
- Li, S., Yan, T., Yang, JQ., Oberley, TD., Oberley, LW. 2000. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.*, 60(14):3927-39.
- Martinez de Toda, I., Garrido, A., Vida, C., Gomez-Cabrera, MC., Viña, J., De la Fuente, M. 2018. Frailty Quantified by the “Valencia Score” as a Potential Predictor of Lifespan in Mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 73(10):1323-1329. doi: 10.1093/gerona/gly064.
- Martínez de Toda, I., Maté, I., Vida, C., Cruces, J., De la Fuente, M. 2016. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging*, 8(11):3110-3119. doi:10.18632/aging.101116.
- Martínez de Toda, I., Vida, C., De la Fuente, M. 2017. An Appropriate Modulation of Lymphoproliferative Response and Cytokine Release as Possible Contributors to Longevity. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(7):1598. doi:10.3390/ijms18071598.
- Martínez de Toda, I., Vida, C., Garrido, A., De la Fuente, M. 2019. Redox parameters as markers of the rate of aging and predictors of lifespan. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, glz033. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz033>.
- Miller, RA. 2001. Biomarkers of aging: prediction of longevity by using age-sensitive T-cell subset determinations in a middle-aged, genetically heterogeneous mouse population. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 56:B180–B186.
- Miller, RA., Harper, JM., Galecki, A., Burke, D. 2002. Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell*, 1:22–29. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00006.x>.
- Neter, J., Kutner, MH., Nachtsheim, CJ., Wasserman, W. 1996. *Applied Linear Regression Models*. 4th Edition WCB McGraw-Hill, New York.
- Perna, G., Iannone, G., Alciati, A., Caldirola, D. 2015. Are Anxiety Disorders Associated with Accelerated Aging? A Focus on Neuroprogression. *Neural Plast.*, 2016:8457612. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8457612>
- Rockwood, K., Blodgett, JM., Theou, O., Sun, M., Feridooni, HA., Mitniski, A., Rose, RA., Godin, J., Gregson, E., Howlett, SE. 2017. A frailty index based on deficit accumulation quantifies mortality risk in humans and in mice. *Sci. Rep.*, 7:43068. doi:10.1038/srep43068.
- Rockwood, K., Song, X., Mitnitski, A. 2011. Changes in relative fitness and frailty across the adult lifespan: evidence from the Canadian National Population Health Survey. *CMAJ.*, 183:E487–E494. doi:10.1503/cmaj.101271.

Swindell, WR., Harper, JM., Miller, RA. 2008. How long will my mouse live? Machine learning approaches for prediction of mouse life span. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 63(9):895-906. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.9.895>.

Vida, C., Martínez de Toda, I., Cruces, J., Garrido, A., Gonzalez-Sanchez, M., De la Fuente, M. 2017a. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol.*, 12:423-437. doi: 10.1016/j.redox.2017.03.005.

Vida, C., Martínez de Toda, I., Garrido, A., Carro, E., Molina, JA., De la Fuente, M. 2017b. Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Front. Immunol.*, 8: 1974. doi:10.3389/fimmu.2017.01974.

Viveros, MP., Arranz, L., Hernanz, A., Miquel, J., De la Fuente, M. 2007. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation*, 14:157-162. doi:10.1159/000110640.

Walf, AA., Frye, CA. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.*, 2(2):322-8. doi: 10.1038/nprot.2007.44.

Whitehead, JC., Hildebrand, BA., Sun, M., Rockwood, MR., Rose, RA., Rockwood, K., Howlett, SE. 2014. A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 69:621-632. doi:10.1093/gerona/glt136.

Original Article

Frailty Quantified by the “Valencia Score” as a Potential Predictor of Lifespan in Mice

Irene Martinez de Toda, MSc,^{1,2} Antonio Garrido, MSc,^{1,2} Carmen Vida, PhD,^{1,2}
Mari Carmen Gomez-Cabrera, PhD,³ Jose Viña, MD,³ and
Monica De la Fuente, PhD, MD^{1,2}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain ²Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain ³ Department of Physiology, Freshage Research Group, University of Valencia, CIBERFES, INCLIVA, Valencia, Spain

Address correspondence to: Mónica De la Fuente, PhD, MD, Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mondela@bio.ucm.es

Received: November 28, 2017; Editorial Decision Date: March 15, 2018

Decision Editor: Rafael de Cabo, PhD

Abstract

The development of frailty scores suitable for mice and which resemble those used in the clinical scenario is of great importance to understand human frailty. The aim of the study was to determine an individual frailty score for each mouse at different ages and analyze the association between the frailty score and its lifespan. For this purpose, the “Valencia Score” for frailty was used. Thus, a longitudinal study in mice was performed analyzing weight loss, running time and speed, grip strength and motor coordination at the late-adult, mature and old ages (40, 56 and 80 weeks old, respectively). These parameters are equivalent to unintentional weight loss, poor endurance, slowness, weakness, and low activity level, respectively, in humans. A cut-off point was used to identify frail mice for each criterion. All the measurements were also performed on chronologically adult prematurely aging mice. The results show that by using the “Valencia Score” for frailty a prematurely aged phenotype can be identified even during the adulthood of animals. This opens up the possibility of carrying out preventive long-term interventions. Moreover, the individual frailty score of a given mouse at the late-adult, mature and old ages is shown to be a relevant predictor of its lifespan.

Keywords: Rate of aging, Longevity, Experimental models

In the last decades, the aim of health care has switched from trying to live longer, to experiencing healthy aging. This is due to the current higher life expectancy being accompanied by an increase in disability rates and consequently, the lack of independence, autonomy, and well-being (1). Disability is often preceded by a state characterized by a diminished ability to respond to different stressors, which has been termed as frailty. In this regard, the current goal of improving healthy life expectancy is to act before disability arises by preventing or delaying the onset of frailty (2).

Thus, frailty is a clinical geriatric syndrome defined by a diminished ability to restore homeostasis after any physical or mental damage, especially due to the absence of regulation of several physiological systems. The consequence of this being that when one individual faces minor stress situations, it results in outcomes like hospitalization, disability, and finally, death (3–7). Another important

characteristic of frailty is that it is reversible, that is, it can be treated and even prevented. This is the reason why it has become necessary to determine which subjects are “frail” in the clinical scenario. In humans, there is a wide number of different scales to quantify frailty with different degrees of difficulty and clinical applicability (8). The two most commonly used ones in the clinical scenario are the phenotype frailty score and the frailty index (FI) based on deficit accumulation. The phenotype frailty score, developed by Fried and colleagues (3), takes into account five criteria: unintentional weight loss, slow walking speed, self-reported exhaustion, weakness and low physical activity. Individuals which meet three or more of these five criteria are classified as frail, individuals that meet one or two are classified as prefrail and those individuals with none are categorized as robust (3). In contrast, the FI, based on deficit accumulation, counts the number of potential health deficits of an individual and divides them

by the total number of items measured (9). Another difference is that in the deficit accumulation approach, the reference values used are those of an adult, whereas in the phenotype frailty score, the reference values of the criteria are those corresponding to the age group studied.

The development of frailty scores suitable for mice and which resemble those that are used in the clinical scenario has become an essential challenge in basic gerontological research (10), given that these would be useful tools to assess the effect of a given intervention in mice before translating it to humans. Thus, some frailty scores have been developed for the quantification of frailty in mice. Most of them have followed the deficit accumulation approach (9), by counting the presence or absence of a different set of deficits in mice (11–15). Following Fried's phenotype frailty score (3), a frailty score has also been developed for the measurement of frailty in mice. It was first proposed by Liu and colleagues (16) and further developed by Gómez-Cabrera and colleagues (17). This last frailty score, which has been named the "Valencia Score" (17), adapts the same criteria to mice that are taken into account in humans (unintentional weight loss, endurance, slowness, weakness, and low activity level). Thus, weight loss, running time and speed, grip strength, and motor coordination were measured in mice. As it takes into account criteria that are closely related to the clinically accepted frailty score and it is simple to use; it may facilitate frailty research in animal models. Moreover, the results would have the potential to translate to clinical settings. Although some of the above-mentioned frailty indices, based on the deficit accumulation approach (14,15), have been shown to be predictive of mortality in mice, it is still not known if the "Valencia Score" would also be able to make this prediction.

Most of the research performed on frailty has been focused on elderly people or mice. However, it is known that the age-related deterioration of the physiological systems does not occur at the same rate in all the individuals of a population with the same chronological age (18). Thus, subjects with the same chronological age can show large differences regarding health status and functional capacity and these interindividual differences can already be quantified at the adult age. This has been recently shown both in humans (19,20) and in mice (12,14,15). Even though some interventions initiated at the old age have been shown to be beneficial in decreasing the frailty status (13,17), the identification of frail individuals at the adult age would enable earlier interventions, which potentially could show more beneficial effects. However, in the "Valencia Score" for frailty, only 17 months old mice and older were studied (17) and it is still not known if it can be used to detect differences in the frailty status within younger mice. In agreement with the heterogeneity of the aging process, previous studies from our group have proposed a natural murine model of premature aging based on an inappropriate reactivity to stress. Thus, when mice are submitted to a simple T-maze test, those that need more time to explore it are classified as prematurely aging mice (PAM), whereas those that show an exceptional response to the maze, needing less time to explore it, are classified as exceptional non-PAM (E-NPAM). In addition, those mice that show an intermediate behavior, which constitute around 80 per cent of the population, are classified as regular non-PAM (R-NPAM). So far, it has been demonstrated that these PAM at the adult age show premature immunosenescence (21,22), an altered neurochemistry (23), higher anxiety-like behaviour (21,24), skeletal alterations (25), higher oxidative stress levels (21,26), and a shorter lifespan (27,28), compared with their counterpart E-NPAM of the same sex and chronological age (reviewed in Refs. 29 and 30).

Hence, the first objective of the present work was to validate the "Valencia Score" in another sex and strain of mice (outbred female ICR-CD1) not previously studied, using a longitudinal study. Thus, a group-frailty score for each age (late-adult, mature, and old) was calculated. A group-frailty score was also calculated for E-NPAM and PAM at the late-adult age. The second objective was to determine an individual frailty score for each mouse at the late-adult, mature, and old ages (using as cut-off values the corresponding performance at each age) throughout a longitudinal study as well as to analyze the association between the frailty score of each mouse at a given age and its respective lifespan. For the longitudinal study, only R-NPAM were used.

Materials and Methods

Experimental Animals

Female ICR/CD1 ex-reproductive mice (*Mus musculus*) of 32 ± 4 weeks were purchased from Janvier Labs (Germany) and placed in the Animal Facility at the Faculty of Biology (Universidad Complutense de Madrid, UCM). Mice were housed at 4–5 per cage. The average temperature in the Animal Facility was $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity was 60 per cent, and a 12/12 hour reversed light/dark cycle (lights on at 20:00h) was maintained to avoid circadian interferences. Mice were checked daily. Water and standard pellets (Panlab, Spain) were available ad libitum.

Classification of mice into E-NPAM, R-NPAM, and PAM using a T-maze test

After 1 week of acclimatization following the arrival of late-adult female ICR/CD1 mice (33 ± 4 weeks), the classification of these animals into PAM and NPAM was carried out. Previous experience in our laboratory has shown that $15 \pm 5\%$ of mice purchased behave as PAM and another $15 \pm 5\%$ behave as E-NPAM. Thus, 80 mice were submitted to the T-maze test in order to obtain enough mice from each type. The T-shaped maze is composed of three wooden arms (each 10 cm wide, 25 cm long, and 10 cm high) covered with black methacrylate. The floor consists of cylindrical aluminum rods that are 3 mm thick and arranged perpendicularly on the side walls. The test was carried out by holding the mouse by its tail and positioning it inside the base of the "T" with its head facing the end wall. Then, the time that each mouse took to cross the intersection of the "T" with both hind legs was measured. This test was performed once per week for a month, to distinguish PAM (which needed more than 10 seconds to cross the intersection at each test the four times) from the NPAM, as described previously (27,28). Depending on the behavior of NPAM, they were divided into E-NPAM (that required less than 10 seconds to cross the intersection at each test the four times) and R-NPAM (those that show an intermediate behavior spending less than 10 seconds sometimes and others more than 10 seconds). This test was always carried out under red light and between 09:00 and 11:00 hours in order to avoid circadian variations. Out of the 80 mice, 60 behaved as R-NPAM (75%), 10 as E-NPAM (12.5%), and 10 as PAM (12.5%). Not all mice were used for the study, only the following groups.

One group of R-NPAM ($n = 10$) was used for the determination of the reference values for the "Valencia Score" at three different ages (40, 56, and 80 weeks, respectively). Another group of animals ($n = 20$), also R-NPAM, was used for the longitudinal study. The "Valencia Score" was carried out at the ages previously mentioned. Maximum lifespan in R-NPAM was 112 weeks with an average lifespan of 76 weeks. The 40 week old mice can be considered as late-adult mice, the 56 week old mice as mature mice, and the 80 week old animals as old mice.

The “Valencia Score” test was also performed in 10 PAM and 10 E-NPAM at the late-adult age (40 ± 4 weeks) only. All the procedures were approved by the Experimental Animal Committee of UCM (Spain) and were in consonance with the European Community Council Directives 2010/63/EU of 22 September 2010 guidelines.

Body Weight

The body weights of the mice were recorded individually 1 month prior to and at the moment of carrying out the “Valencia Score” for frailty. When a given mouse lost more than 5 per cent of its weight compared with the previous month, it was considered frail for this criterion. This cut-off was selected in order to resemble the Fried’s phenotype frailty score for humans, which considers the loss of 5 per cent of body weight in the previous year as a frailty criterion (3).

Motor Coordination Test

The tight-rope test described by Miquel (31) and widely used by others (32) was used with the following modifications. Mice were placed in the middle of a bar of circular section (60 cm long and 1.5 cm diameter) and the test was considered successful if the mouse was able to reach either the end of the bar, or if it did not fall, during a period of 60 seconds in at least one out of the five consecutive trials.

Incremental Treadmill Test

Mice were submitted to an intensity treadmill test (Model LE8706, Panlab). The protocol of Davidson and coworkers (33) was used with the following modifications. Mice were placed on the treadmill at an initial speed of $6 \text{ m} \times \text{minutes}^{-1}$ for 6 minutes (warm-up period). After it, the treadmill band speed was increased by $2 \text{ m} \times \text{minutes}^{-1}$ every 2 minutes until the animals were exhausted. Exercise motivation was administered by the presence of an electric shock grid at the base of the treadmill. Exhaustion was defined as the refusal to run after three consecutive tail shocks. The maximum running time and running speed were recorded as measurements of their endurance and slowness, respectively.

Grip Strength Test

The Grip Strength Meter (Panlab. Harvard Apparatus) was used to measure the maximum force displayed by a mouse. Briefly, the grip strength meter was positioned horizontally and mice were held by the tail and lowered toward the apparatus. Animals were allowed to grasp the metal bar with their forelimbs and then they were pulled backwards in the horizontal plane (34). Maximum peak force of each mouse was automatically registered in grams-force. The test was performed five consecutive times. Since the weight influences the force of an animal, the net grip strength was adjusted by dividing the registered force by the weight of the animal.

Data Analysis

Analysis was performed with SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA) software. Normality of the samples was checked by the Kolmogorov–Smirnov test and homogeneity of the variances was checked by the Levene test. Age-related differences in running time, running speed, and grip strength were studied using a one-way analysis of variance followed by post hoc analysis. The Tukey test was used for post hoc comparisons when variances were homogeneous, whereas Games–Howell analysis was used when variances were not homogeneous. Age-related differences regarding the tight-rope test and weight loss, as well as in the prevalence of frailty, were analyzed using Pearson’s

chi-squared test. Differences in lifespan were investigated using the Kaplan–Meier test, with a minimum significance level (log rank, Mantel–Cox) set at $p < .05$. Two-sided $p < .05$ was considered the minimum level of significance.

Results

Group-Frailty, Quantified by the “Valencia Score,” Is Higher in PAM and Correlates With Lifespan

The results show that both mature and old R-NPAM experience a decrease in the running time (endurance) as well as in the running speed (slowness) compared with when they are late-adults ($p < .01$ for mature mice; $p < .001$ for old mice). Old mice also experience a decrease in both components compared with when they are mature ($p < .05$ in running time; $p < .01$ in running speed) (Figure 1A and C). Regarding the premature aging model, chronologically adult PAM

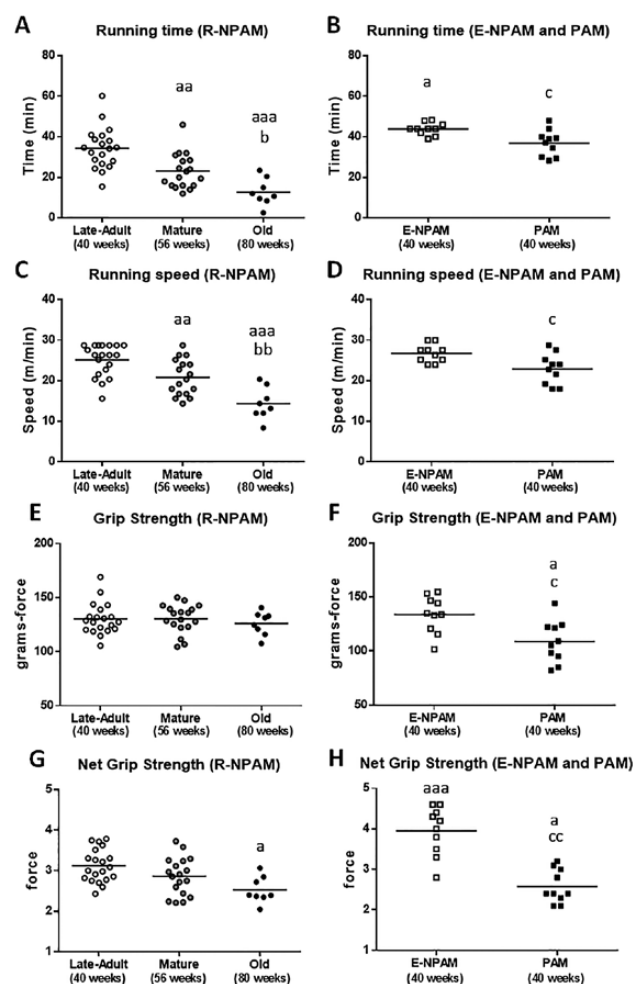


Figure 1. Running time (A), running speed (C), grip strength (E), and net grip strength (G) values in R-NPAM at the late-adult ($n = 20$), mature ($n = 18$), and old ($n = 8$) ages (40, 56, and 80 weeks old, respectively). The values corresponding to PAM ($n = 10$) and E-NPAM ($n = 10$) are shown in (B), (D), (F), and (H), respectively. These values were only compared with those of R-NPAM at the adult age. Statistical differences were tested using one-way ANOVA. a: $p < .05$; aa: $p < .01$; aaa: $p < .001$ with respect to the values in late-adult mice. b: $p < .05$; bb: $p < .01$ with respect to the values in mature individuals. c: $p < .05$; cc: $p < .01$ with respect to the values in E-NPAM.

show lower running time and speed than E-NPAM ($p < .05$), whereas no statistically significant differences are found between PAM and late-adult R-NPAM (Figure 1B and D). Strikingly, E-NPAM show a higher running time than the late-adult R-NPAM ($p < .05$).

Weakness is another key component of the diagnosis of clinical frailty (3). Thus, weakness of mice was investigated by measuring grip strength. As shown in Figure 1E, there are no age-related changes regarding grip strength in R-NPAM, whereas PAM show lower values than E-NPAM and late-adult R-NPAM ($p < .05$) (Figure 1F). There are many studies, all of them carried out in humans, which have found a positive correlation between grip strength and BMI or weight (35–37). Thus, in order to avoid differences in grip strength due to differences in body weight, a net grip strength variable was calculated by dividing the peak force registered for each animal by its weight. The results (Figure 1G) show that old R-NPAM experience a decrease regarding net grip strength compared with when they are late-adult ($p < .05$). In regard to the premature aging model, chronologically adult PAM show lower net grip strength than E-NPAM and R-NPAM ($p < .01$, $p < .05$, respectively) (Figure 1H). Strikingly, E-NPAM show higher net grip strength than late-adult R-NPAM ($p < .001$).

The tight-rope test is a broadly used and extensively validated behavioral marker of aging (32,39). The modified protocol used in the present study was considered a good marker of motor coordination, which was quantified as the percentage of mice that succeeded in performing the test (17). In addition, unintentional weight loss was quantified as the percentage of mice that succeeded in not losing more than 5 per cent of their body weight compared with the previous month. The results (Figure 2A) show that old R-NPAM experience a decrease in the percentage of success in performing the tight-rope test in comparison to when they are late-adult ($p < .01$) and mature ($p < .05$). PAM have a lower percentage of success than E-NPAM, although nonstatistically significant differences are found (Figure 2B). Regarding weight loss, a tendency

towards an age-related decrease in the ability to maintain body weight is observed, although no statistically significant differences are found at the different times of study in R-NPAM as well as in PAM (Figure 2C and D).

Based on the performance of mice at each age studied, reference values were obtained for each age by selecting the value of the 20th percentile for the variables running speed, running time, and net grip strength (Figure 3A). The variable net grip strength (grip strength/weight) was used instead of grip strength, given that the first showed a more marked age-related decrease (Figure 1E and G). Therefore, each mouse that ranked below the 20th percentile for any of these criteria was considered as a failure for that criterion. Regarding motor coordination and weight loss components, each mouse that failed to complete the tightrope test or lost more than 5 per cent of its body weight compared to the previous month, respectively, was considered as a failure for that criterion.

For the calculation of the frailty score for each age group (late-adult, mature, and old R-NPAM), the corresponding age-matching reference values were applied. Each group-frailty score, expressed as a percentage, was obtained by dividing the total number of tests failed by the mice of each age, by the total number of tests performed by these mice. As can be seen in Figure 3C, the frailty score for late-adult R-NPAM is 15, for mature R-NPAM is 21, and for old R-NPAM is 25. These frailty scores cannot be compared among them, and they just represent an average frailty score for mice at these ages. In addition, following the same procedure described above, group-frailty was also calculated for adult PAM and E-NPAM by using the reference values of adults. Therefore, these group-frailties can be compared with adult R-NPAM. Figure 3D shows that PAM display a group-frailty score higher than the one for adult R-NPAM. In contrast, E-NPAM have a group-frailty score of 0, even lower than that obtained in the group of adult R-NPAM. In addition, PAM exhibited a shorter lifespan than the group of R-NPAM and E-NPAM ($p < .001$), whereas the E-NPAM showed a longer lifespan than the group of R-NPAM ($p < .01$) (Figure 3B).

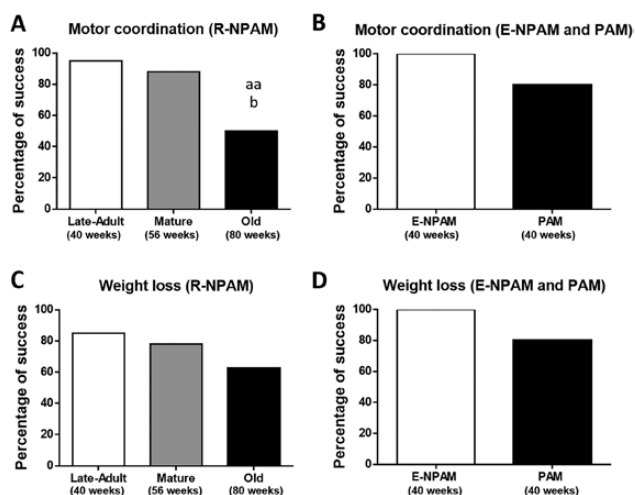


Figure 2. Percentage of success in the tight-rope test (A) and unintentional weight loss (C) of R-NPAM at the late-adult ($n = 20$), mature ($n = 18$), and old ($n = 8$) ages (40, 56, and 80 weeks old, respectively). The results corresponding to PAM ($n = 10$) and E-NPAM ($n = 10$) are shown in (B) and (D), respectively. Data regarding weight loss are expressed as percentage of mice that did not lose more than 5 per cent of their weight compared with the previous month. Statistical differences were tested using Pearson's chi-squared test. aa: $p < .01$ with respect to the values in late-adult mice. b: $p < .05$ with respect to the values in mature individuals.

The Individual Frailty Scores at Each Age Studied Correlate With Lifespan

Given that the frailty profile is subjected to deficit accumulation and that the age-related deterioration of the physiological systems does not occur at the same rate in all subjects with the same chronological

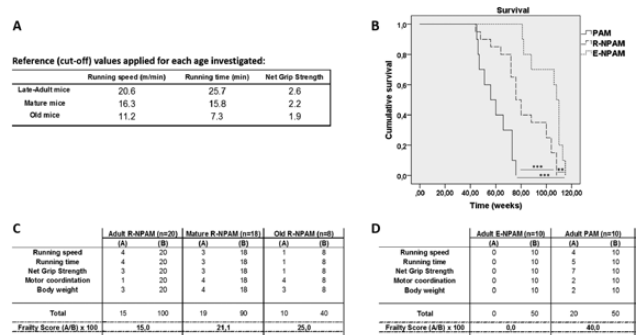


Figure 3. (A) Reference values applied for each age investigated. (B) Kaplan-Meier cumulative survival curves of E-NPAM ($n = 10$), R-NPAM ($n = 20$), and PAM ($n = 10$). (C) Group-frailty score for adult, mature, and old R-NPAM obtained using, respectively, adult, mature, and old cut-off values as references. (D) Group-frailty score for chronologically adult E-NPAM and PAM obtained using adult cut-off values as references. Statistical differences between lifespans were tested using the Kaplan-Meier log-rank test. **: $p < .01$; ***: $p < .001$.

age, an individual frailty score was calculated for each mouse at each age by counting how many components of the test they failed. Again, depending on the age of the mouse, the corresponding reference values were applied as cut-offs. Thus, if a mouse failed three or more components out of the five that conform the test, it was considered as frail. If it failed one or two criteria, it was classified as prefrail, whereas if it did not fail any criteria it was considered as robust, according to the clinical classification for Fried's Frailty Score (3). The results demonstrate that frailty within a group of mice of the same chronological age is very heterogeneous. Thus, at the late-adult age, within the group of R-NPAM, 10 per cent are frail, 20 per cent are prefrail, and 70 per cent are robust. Within the group of PAM, 40 per cent are frail, 40 per cent are prefrail, and only 20 per cent are robust, whereas within the group of E-NPAM all mice are robust (Figure 4A).

In addition, individual frailty scores were also calculated at the mature and old ages by using as cut-off values the reference values at these ages. The results show that 44.5 per cent of the mature mice were robust, 44.5 per cent were prefrail, whereas 11 per cent were frail. Regarding the prevalence of frailty at the old age, it was found out that 50 per cent of the old mice were robust, 37.5 per cent were prefrail, whereas 12.5 per cent were considered frail (Figure 4B).

Due to the observed heterogeneity regarding the individual frailty score of each mouse and given that the lifespan of each mouse was monitored individually, it was possible to investigate the relationship between the individual frailty score of a given mouse obtained at a given age, and its corresponding lifespan. Within the group of adult R-NPAM (Figure 5A), those mice which were prefrail and frail at the adult age lived significantly less time than their robust counterparts ($p < .01$, $p < .001$, respectively) and the frail mice even less than the prefrail ones ($p < .05$). Within the group of adult PAM (Figure 5B), those mice that were frail at the adult age lived significantly less than their robust counterparts ($p < .05$).

In addition, the relationship between the individual frailty score of R-NPAM at the mature and old ages of each mouse (by using as

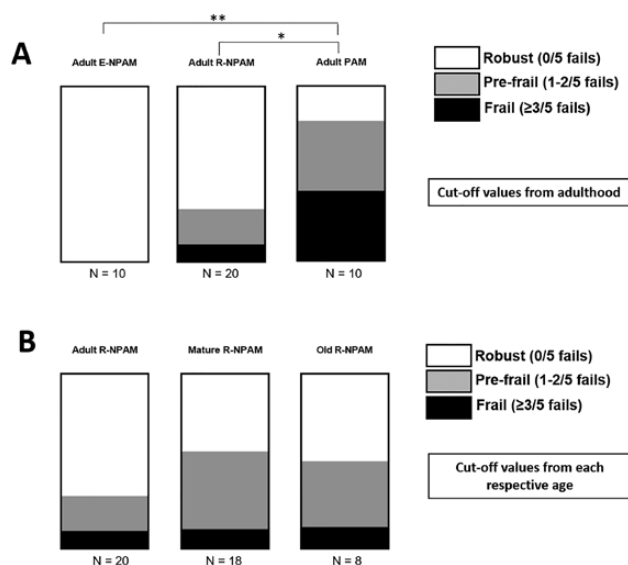


Figure 4. (A) Frequencies of robust, prefrail, and frail mice in E-NPAM, R-NPAM, and PAM groups obtained using adult cut-off values as references. (B) Frequencies of robust, prefrail, and frail mice in adult, mature, and old R-NPAM groups obtained using adult, mature, and old cut-off values as references, respectively. Statistical differences were tested using Pearson's chi-squared test. *: $p < .05$; **: $p < .01$.

cut-off values the reference values of their corresponding ages) and its respective lifespan was also studied. Within the group of mature R-NPAM (Figure 5C), those mice that were frail at the mature age lived significantly less than their robust ($p < .01$) and prefrail ($p < .05$) counterparts. In addition, within the group of old R-NPAM (Figure 5D), those that were frail at the old age lived significantly less than their robust counterparts ($p < .05$).

Discussion

It has been stated that in order to determine how to promote a healthy life expectancy in humans, common grounds between animal studies and clinical trials must be found (40). Several functions known to experience an age-related decline in humans can also be assessed in rodents. But many physiological tests that have been established in humans either do not exist or cannot be applied to aging experimental animals (40). Thus, the "Valencia Score" (17) becomes a useful tool for the quantification of frailty in mice, since it is noninvasive, simple and has the advantage of being comparable to the one that is routinely performed in humans, the Fried's phenotype frailty score (3). However, in order to increase the potential applicability and translation of the "Valencia Score" results to humans, it is necessary to validate it in other mouse strains, as previously stated (15). Thus, the present study validates the use of the "Valencia Score" (17) for the quantification of frailty in outbred female ICR-CD1 mice. This is a novel finding giving that most of the research performed on frailty in mice has used inbred strains, which are less comparable to humans. Thus, data obtained in outbred strains, such as ICR-CD1, have a higher potential for clinical translation (41). The results show that as the mice aged, they showed a worse performance in the various tests that comprise the "Valencia Score": running time, running speed, net grip strength, motor coordination, and weight loss, validating these criteria as good markers for the establishment of a frailty score in experimental animals.

In addition, in the present study, frailty has been quantified in a model of prematurely aging mice, in order to shed light into the link between aging and frailty. Recently, frailty was quantified by the

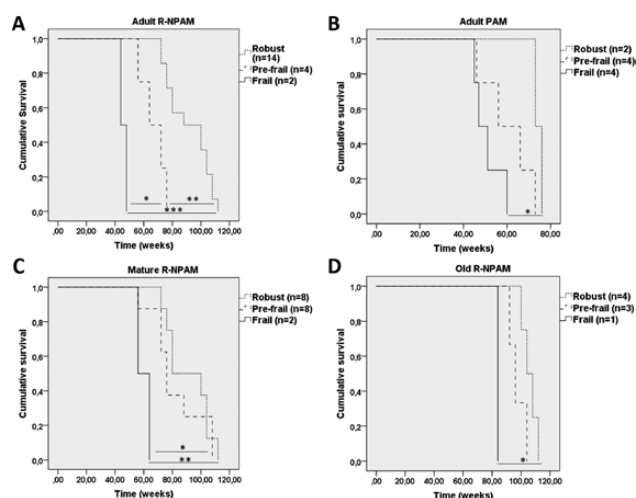


Figure 5. Kaplan-Meier cumulative survival curves stratified in mice classified as robust, pre-frail and frail at the late-adult age (A), at the mature age (C), and at the old age (D) within the group of R-NPAM, as well as in adult PAM (B). Statistical differences between lifespans were tested using Kaplan-Meier log-rank test. *: $p < .05$; **: $p < .01$; ***: $p < .001$.

mouse FI (12), based on deficit accumulation, in the DBA/2J mouse strain, which is known to be short-lived. However, a higher frailty was only detected in males, compared with the frailty of the long-lived strain C57/BL6 (13). The quantification of frailty in the prematurely aging mice used in the present study has an important advantage over others, given that it is a natural model without genetic manipulation. PAM are just a fraction of the mice population which ages faster than their counterparts, and this makes the results more comparable to human subjects. The results demonstrate that the group of PAM, despite being adults, shows a higher frailty score to that obtained in adult R-NPAM, whereas the group of E-NPAM of the same age shows a frailty score of 0, even lower than the one obtained for R-NPAM. Thus, PAM are also prematurely frail. Moreover, the PAM group exhibited a shorter lifespan than the R-NPAM and E-NPAM groups, whereas E-NPAM displayed a longer lifespan than the R-NPAM group. Thus, these results demonstrate that there is a relationship between the frailty score, calculated by the “Valencia Score”, of a group of mice at the late-adult age and their respective lifespans.

The use of the “Valencia Score” for quantification of frailty in a group as a whole has been shown to be useful in quantifying the effect of a given intervention, such as exercise, on frailty (17). However, quantification of individual frailty scores by the “Valencia Score” has not been performed. So far, the only studies that have calculated an individual frailty score for each mouse at different ages, throughout a longitudinal design, have used the FI based on deficit accumulation. The first one, proposed by Whitehead and colleagues (12) and further used by Kane and colleagues and Rockwood and colleagues (13,14), is a 31-item FI based on Signs of Clinical Deterioration in mice (hair loss, tremor, gait, etc.). This 31-item FI has been shown to be an indicator of biological age, given its relation to mortality. Although very complete, the translation of this FI to clinical practice seems difficult especially because the parameters used do not coincide with the accepted measures used clinically to define frailty in humans. The Physiological Frailty Index (PFI), proposed by Antoch and colleagues (15), is a 12-item Frailty Score that takes into account the variable grip strength plus another 11 biochemical ones (such as diastolic pressure, number of lymphocytes, and haematocrit). This score, although easier to implement, lacks relevant deficits that are predictors of frailty such as walking speed or motor coordination. It has been successfully applied to quantify the effect of dietary and pharmaceutical interventions on the FI. However, the link between individual frailty scores and respective lifespans was not studied, and the FI of a group was not always predictive of its lifespan.

Therefore, the present study is the first one that has calculated an individual frailty score for each mouse at different ages, throughout a longitudinal design, by using the “Valencia Score” which is based on Fried’s phenotype frailty score. It is important to remark that in contrast to the frailty indices based on deficit accumulation, which take as reference values those from young adults, the “Valencia Score” requires the establishment of reference values (cut-off values) at each age. Thus, for the longitudinal design carried out in the present study, reference values were obtained at the late-adult, mature, and old ages, and frailty scores were therefore calculated at the same ages by using the age-matching values as cut-offs. Therefore, the prevalence of frail individuals at the adult, mature, and old ages was of 10, 12, and 11 per cent, respectively. This does not mean that frailty does not increase, given that they were calculated based on the performance of age-matching mice and therefore cannot be compared within themselves.

In humans, the ability of a FI to predict variable vulnerability of individuals with the same chronological age has been referred to as

their biological age (42). The “Valencia Score” developed for mice serves as an indicator of their biological age, given the high correlation between the individual frailty score of a mouse (independently of the age point at which it was established) and its respective lifespan. Thus, mice considered frail and prefrail showed a shorter lifespan compared to those that were robust at all ages studied. Moreover, those that were considered frail had a shorter lifespan than the prefrail ones. However, it should be taken into account that although biological age and frailty are closely related terms, they do not necessarily overlap. In fact, within the group of PAM, even though they are prematurely aged, differences within their individual frailty state were found. Thus, frail PAM, prefrail PAM, and robust PAM were observed, with the different frailty score having an impact on the lifespan achieved by each mouse. Noticeably, biological age seems to have a dominant role over the frailty score given that robust PAM have a shorter lifespan than robust R-NPAM. Thus, the individual frailty score, calculated by the “Valencia Score,” could be a useful analytic tool providing additional information in order to better define or classify individuals as prematurely aged.

In summary, the “Valencia Score” for frailty has been shown to be useful in quantifying frailty in outbred female ICR-CD1 mice. The original contribution from the study is the demonstration that the “Valencia Score” can be applied for the calculation of an individual frailty score at the late-adult, mature, and old ages, acting as a sensitive predictor of lifespan. Moreover, the “Valencia Score” can be applied to quantify group-frailty in prematurely aging mice models in order to distinguish variable susceptibility to adverse events already at the adult age. The identification of frail adult mice opens up the possibility of carrying out long-term interventions, such as nutritional or exercise-based ones, starting at adult age as a preventive measure. These facts, together with the noninvasive and simple techniques used as well as the clinically relevant criteria that the “Valencia Score” takes into account, make it a good tool for obtaining frailty indices for experimental models. This allows longitudinal studies, to be performed in any laboratory. The results are likely to have potential applications in clinical settings. One limitation of the study is that reproducibility of the frailty scores obtained for each mouse was not investigated. Those calculations were only performed once in each mouse at each age point. As another consideration, it would have been interesting to obtain frailty scores on even older animals to explore the limits of frailty in mice by the “Valencia Score.”

Funding

This work was supported by grants of the Research group of UCM (910379), Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD12/0043/0018) and (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union. J.V. and M.C.G.C. are supported by grants AICO/2016/076, SAF2016-75508-R, and ISCIII2012-RED-43-029 from RETICEF, CB16/10/00435 (CIBERFES), and PROMETEO2010/ 074.

Conflict of interest statement

None declared.

References

1. Rodríguez-Mañás L, Fried LP. Frailty in the clinical scenario. *Lancet*. 2015;385:e7–e9. doi:10.1016/S0140-6736(14)61595-6.
2. Goggins WB, Woo J, Sham A, Ho SC. Frailty index as a measure of biological age in a Chinese population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60:1046–1051. doi:10.1093/gerona/60.8.1046

3. Fried LP, Tangen CM, Walston J, et al.; Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56:M146–M156. doi:10.1093/gerona/56.3.M146
4. Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y, et al.; Osteoporotic Fractures in Men Research Group. Frailty in older men: prevalence, progression, and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc*. 2007;55:1216–1223. doi:10.1111/j.1532-5415.2007.01259.x.
5. Avila-Funes JA, Helmer C, Amieva H, et al. Frailty among community-dwelling elderly people in France: the three-city study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63:1089–1096. doi:10.1093/gerona/63.10.1089
6. Ensrud KE, Ewing SK, Cawthon PM, et al.; Osteoporotic Fractures in Men Research Group. A comparison of frailty indexes for the prediction of falls, disability, fractures, and mortality in older men. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57:492–498. doi:10.1111/j.1532-5415.2009.02137.x.
7. Inglés M, Gambini J, Carnicero JA, et al. Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty. *J Am Geriatr Soc*. 2014;62:1324–1328. doi:10.1111/jgs.12876.
8. de Vries NM, Staal JB, van Ravensberg CD, Hobbelen JS, Olde Rikkert MG, Nijhuis-van der Sanden MW. Outcome instruments to measure frailty: a systematic review. *Ageing Res Rev*. 2011;10:104–114. doi:10.1016/j.arr.2010.09.001.
9. Mitnitski AB, Mogilner AJ, Rockwood K. Accumulation of deficits as a proxy measure of aging. *ScientificWorldJournal*. 2001;1:323–336. doi:10.1100/tsw.2001.58.
10. Walston J, Fedarko N, Yang H, et al. The physical and biological characterization of a frail mouse model. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63:391–398. doi:10.1093/gerona/63.4.391
11. Parks RJ, Fares E, Macdonald JK, et al. A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:217–227. doi:10.1093/gerona/glr193.
12. Whitehead JC, Hildebrand BA, Sun M, et al. A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69:621–632. doi:10.1093/gerona/glt136.
13. Kane AE, Hilmer SN, Mach J, Mitchell SJ, de Cabo R, Howlett SE. Animal models of frailty: current applications in clinical research. *Clin Interv Aging*. 2016;11:1519–1529. doi:10.2147/CIA.S105714.
14. Rockwood K, Blodgett JM, Theou O, et al. A frailty index based on deficit accumulation quantifies mortality risk in humans and in mice. *Sci Rep*. 2017;7:43068. doi:10.1038/srep43068.
15. Antoch MP, Wrobel M, Kuropatwinski KK, et al. Physiological frailty index (PFI): quantitative in-life estimate of individual biological age in mice. *Aging (Albany NY)*. 2017;9:615–626. doi:10.18632/aging.101206.
16. Liu H, Graber TG, Ferguson-Stegall L, Thompson LV. Clinically relevant frailty index for mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69:1485–1491. doi:10.1093/gerona/glt188.
17. Gomez-Cabrera MC, Garcia-Valles R, Rodriguez-Mañas L, et al. A new frailty score for experimental animals based on the clinical phenotype: inactivity as a model of frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72:885–891. doi:10.1093/gerona/glw337.
18. De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des*. 2009;15:3003–3026. doi:10.2174/138161209789058110
19. Rockwood K, Song X, Mitnitski A. Changes in relative fitness and frailty across the adult lifespan: evidence from the Canadian National Population Health Survey. *CMAJ*. 2011;183:E487–E494. doi:10.1503/cmaj.101271.
20. Belsky DW, Caspi A, Houts R, et al. Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:E4104–E4110. doi:10.1073/pnas.1506264112
21. Pérez-Alvarez L, Baeza I, Arranz L, et al. Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev Comp Immunol*. 2005;29:965–976. doi:10.1016/j.dci.2005.02.008.
22. Martínez de Toda I, Maté I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M. Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:3110–3119. doi:10.18632/aging.101116.
23. De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernández B, Viveros MP. Characterization of monoaminergic systems in brain regions of pre-maturely ageing mice. *Neurochem Int*. 2003;43:165–172. doi:10.1016/S0197-0186(02)00212-7
24. Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol*. 2001;114:80–88. doi:10.1016/S0165-5728(00)00457-4
25. Portal-Núñez S, Manassra R, Lozano D, et al. Characterization of skeletal alterations in a model of prematurely aging mice. *Age (Dordr)*. 2013;35:383–393. doi:10.1007/s11357-011-9372-8.
26. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14:157–162. doi:10.1159/000110640.
27. Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2002;37:249–256. doi:10.1016/S0531-5565(01)00190-5
28. Guayerbas N, De La Fuente M. An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol*. 2003;27:339–350. doi:10.1016/S0145-305X(02)00103-9
29. Vida C, De la Fuente M. Stress-related Behavioural Responses, Immunity and Ageing in Animal Models. In: Bosch J, Phillips A, Lord J, eds. *Immunosenescence*. New York, NY: Springer; 2012:125–144. doi:10.1007/978-1-4614-4776-4_8
30. Vida C, González EM, De la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des*. 2014;20:4656–4678. doi:10.2174/1381612820666140130201734
31. Yang Y, Lee CL. Dynamics and heterogeneity in the process of human frailty and aging: evidence from the U.S. older adult population. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2010;65B:246–255. doi:10.1093/geronb/gbp102
32. Miquel J, Blasco M. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol*. 1978;13:389–396. doi:10.1016/0531-5565(78)90049-9
33. Matheu A, Maraver A, Klatt P, et al. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature*. 2007;448:375–379. doi:10.1038/nature05949.
34. Davidson SR, Burnett M, Hoffman-Goetz L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38:250–255. doi:10.1249/01.mss.0000183179.86594.4f.
35. Crabbe JC, Cotnam CJ, Cameron AJ, et al. Strain differences in three measures of ethanol intoxication in mice: the screen, dowel and grip strength tests. *Genes Brain Behav*. 2003;2:201–213. doi:10.1034/j.1601-183X.2003.00023.x
36. Pieterse S, Manandhar M, Ismail S. The association between nutritional status and handgrip strength in older Rwandan refugees. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:933–939. doi:10.1038/sj.ejcn.1601443.
37. Lad UP, Satyanarayana P, Shisode-Lad S, Siri ChC, Kumari NR. A study on the correlation between the body mass index (BMI), the body fat percentage, the handgrip strength and the handgrip endurance in underweight, normal weight and overweight adolescents. *J Clin Diagn Res*. 2013;7:51–54. doi:10.7860/JCDR/2012/5026.2668.
38. Ervin RB, Fryar CD, Wang CY, Miller IM, Ogden CL. Strength and body weight in US children and adolescents. *Pediatrics*. 2014;134:e782–e789. doi:10.1542/peds.2014-0794.
39. Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*. 2008;135:609–622. doi:10.1016/j.cell.2008.09.034.
40. Fontana L, Kennedy BK, Longo VD, Seals D, Melov S. Medical research: treat ageing. *Nature*. 2014;511:405–407. doi:10.1038/511405a.
41. von Zglinicki T, Varela Nieto I, Brites D, et al. Frailty in mouse ageing: a conceptual approach. *Mech Ageing Dev*. 2016;160:34–40. doi:10.1016/j.mad.2016.07.004.
42. Mitnitski AB, Mogilner AJ, MacKnight C, Rockwood K. The mortality rate as a function of accumulated deficits in a frailty index. *Mech Ageing Dev*. 2002;123:1457–1460. doi:10.1016/S0047-6374(02)00082-9

CAPÍTULO CUATRO: Validación de parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio como marcadores, en humanos, de envejecimiento acelerado, patológico y como predictores de supervivencia en centenarios tras un ingreso hospitalario e indicadores de recuperación.

Biogerontology

High perceived stress is linked to oxidation, inflammation, immunosenescence and accelerated aging

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	High perceived stress is linked to oxidation, inflammation, immunosenescence and accelerated aging	
Article Type:	Original Article	
Section/Category:	Research Article	
Keywords:	stress perception; immunosenescence; oxidative stress; inflammatory stress; biological age	
Corresponding Author:	Monica De La Fuente Madrid, SPAIN	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:		
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Irene Martínez de Toda	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Irene Martínez de Toda Lara Miguélez León Siboni Carmen Vida Monica De La Fuente	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	ISCIII-FEDER of the European Union (FIS (PI15/01787))	Not applicable
Abstract:	<p>Chronic stress situations lead to an impairment of immune response and higher oxidative and inflammatory stress, which are important underlying mechanisms of the aging process. However, given that the physiological stress response depends on the subjective appraisal of a given stressor, the aim of the study was to investigate the effect that different degrees of perceived stress have, regardless of the type of stress, on immune functions, oxidative and inflammatory stress and aging rate of adult to middle-aged women (30 to 50 years old). For that purpose, a group of 49 women were classified according to their scores obtained in the perceived stress scale (PSS) into low (n=23), moderate (n=14) and high (n=12) degree of perceived stress. The immune functions studied were: neutrophil and lymphocyte chemotaxis, neutrophil phagocytic capacity, Natural Killer activity, lymphoproliferation and LPS-stimulated cytokine release. Basal cytokine release was studied as an inflammatory stress marker. Antioxidant (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reductase activities, and reduced glutathione) and oxidant compounds (oxidized glutathione and malondialdehyde) were also investigated in whole blood as markers of oxidative stress. The results show that, in general, women with moderate or high degree of perceived stress have a worse immune functionality and higher oxidative and inflammatory stress compared to women with low stress perception. In addition, a positive correlation was found between PSS scores and the biological age of each woman ($P \leq 0.001$). In conclusion, high levels of perceived stress are associated with a higher oxidative and inflammatory stress, immunosenescence and consequently, an accelerated aging.</p>	

High perceived stress is linked to oxidation, inflammation, immunosenescence and accelerated aging

Irene Martínez de Toda^{1,2}, Lara Miguélez¹, León Siboni¹, Carmen Vida^{1,2}, Mónica De la Fuente^{1,2}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

²Institute of Biomedical Research Hospital 12 Octubre (imas12), Madrid, Spain

Corresponding Author: Mónica De la Fuente, PhD, MD, Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. Telephone number: 91 394 4989. E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

Abstract

Chronic stress situations lead to an impairment of immune response and higher oxidative and inflammatory stress, which are important underlying mechanisms of the aging process. However, given that the physiological stress response depends on the subjective appraisal of a given stressor, the aim of the study was to investigate the effect that different degrees of perceived stress have, regardless of the type of stress, on immune functions, oxidative and inflammatory stress and aging rate of adult to middle-aged women (30 to 50 years old). For that purpose, a group of 49 women were classified according to their scores obtained in the perceived stress scale (PSS) into low (n=23), moderate (n=14) and high (n=12) degree of perceived stress. The immune functions studied were: neutrophil and lymphocyte chemotaxis, neutrophil phagocytic capacity, Natural Killer activity, lymphoproliferation and LPS-stimulated cytokine release. Basal cytokine release was studied as an inflammatory stress marker. Antioxidant (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reductase activities, and reduced glutathione) and oxidant compounds (oxidized glutathione and malondialdehyde) were also investigated in whole blood as markers of oxidative stress. The results show that, in general, women with moderate or high degree of perceived stress have a worse immune functionality and higher oxidative and inflammatory stress compared to women with low stress perception. In addition, a positive correlation was found between PSS scores and the biological age of each woman ($P \leq 0.001$). In conclusion, high levels of perceived stress are associated with a higher oxidative and inflammatory stress, immunosenescence and consequently, an accelerated aging.

Keywords: stress perception, immunosenescence, oxidative stress, inflammatory stress, biological age

Introduction

The responses related to the survival of an organism are frequently the cause of its deterioration when the levels of the mediators of these responses escape from homeostatic control (Vida et al. 2014). The response to stress is the best example of the function of the communication between the homeostatic systems (the nervous, the endocrine and the immune system), which constitutes the neuroimmunoendocrine communication (Del Rey and Besedovsky 2017). The stress response can be defined as the adaptive physiological modifications that occur in response to any internal or external changes or threats (stressors). Thus, an individual reacts to a physical or mental stressor that is potentially health threatening by activating interconnected neuroimmunoendocrine circuits. This pro-survival response allows the body to face and

deal with the challenge and re-establish homeostatic equilibrium. However, if the individual perceives a noxious stimulus as too intense, or its duration as too long, he/she may fail coping with it, maladaptation occurs, neuroimmunoendocrine parameters remain altered and illness may ensue (Mariotti 2015, De La Fuente 2018).

Given the importance that the immune system has on the maintenance of health (De La Fuente and Miquel 2009; Martínez de Toda et al. 2016), the effect that different types of stressful stimuli have on its functional capacity, has been the subject of extensive research. However, both enhancement and suppression of immune response have been reported depending on the type, duration and magnitude of the stressor, among other factors (Segerstrom and Miller 2004; Lucas et al. 2007; Godoy et al. 2018). Nevertheless, chronic stress situations have been

associated with a defective immune functional capacity (Rohleder 2012, Cruces et al. 2014). Moreover, chronically stressed individuals display high levels of pro-inflammatory mediators (Salim et al. 2011), which has been explained as a consequence of a glucocorticoid-resistance (Miller et al. 2002). Thus, the diminished capacity of the immune system to respond to the anti-inflammatory action of cortisol, triggers the establishment of inflammatory processes. In addition, enhanced pro-inflammatory cytokine signalling may promote generation of reactive oxygen species (ROS) and lead to oxidative damage, given that oxidation and inflammation are interlinked processes (Vida et al. 2014; De La Fuente 2018). Consequently, chronic stress has also been associated with higher levels of oxidative damage (Irie et al. 2003; Forlenza and Miller 2006; Salim 2016; De La Fuente 2018).

According to the oxidative-inflammatory theory of aging (De La Fuente and Miquel 2009), chronic oxidative and inflammatory stress situations are the basis of the age-related impairment of the homeostatic systems (the nervous, endocrine, and immune systems) as well as of their bidirectional communication, which results in an increased morbidity and mortality. Therefore, given that an inappropriate response to stress is associated with increased inflammatory and oxidative stress and an impaired immune function, it can accelerate the rate of aging (De La Fuente 2018). In fact, it has been demonstrated that mice with chronic hyper-reactivity to stress and anxiety show a higher oxidative stress, a premature immunosenescence and frailty and a shorter life span than those with an appropriate response to stress (Vida et al. 2014; Martínez de Toda et al. 2018).

Importantly, stress-related immune changes have been reported to be very different not only depending on the type, duration or intensity of stressors but also on the characteristics of each individual (personality, life experiences, social situation, controllability, and perception of the situation, among others). All these, cause a very high inter-individual variability in responses (De La Fuente 2018). However, the subjective perception of a given stressor is an aspect that has been less taken into account when studying functional, oxidative and inflammatory stress parameters of immune cells. Importantly, cognitive mechanisms mediating stress perception, coping, sense of control and psychosocial factors such as social support are critical determinants of the duration and magnitude of the physiological stress response (Dhabhar 2009). Consequently, this leads to a positive or negative outcome. One of the most

popular tools for measuring subjective perception of stress is The Perceived Stress Scale (PSS; Cohen et al. 1983), which constitutes a self-reported questionnaire that was designed to measure “the degree to which individuals appraise situations in their lives as stressful” (Cohen et al. 1983). The PSS items evaluate the degree to which individuals believe their life has been unpredictable, uncontrollable, and overloaded during the previous month (Lee 2012). Given that the degree of perceived stress is the result of daily stressors and life events as well as of the means and resources that the person has at a given moment (Remor 2006), it is an indicator of the capacity to respond to stress.

For all these reasons, the goal of the study was to investigate the effects that different degrees of perceived stress (such as low, moderate or high), regardless of the type of stress, have on the function of immune cells, on the oxidative and inflammatory stress of whole blood and consequently, on the aging rate of adult to middle-aged women.

Materials and Methods

Subjects. The study was performed using 49 women aged from 30 to 50 years. All subjects were Spanish and recruited from the population of Madrid. They were submitted to the 14-Item Perceived Scale Stress (PSS) and depending on the scores obtained were classified into three groups: Low, Moderate and High perceived stress (see Table 1 for demographic data of three groups). None of the participants received any kind of psychopharmacological treatment or psychotherapy. Exclusion criteria consisted of malnourishment, pregnancy, severe allergies, immunodeficiency or autoimmune diseases, neoplasia, rheumatic fever, diabetes, seizures, endocrine disorders, anemia, radiation therapy, chemotherapy, intake of adrenal corticosteroids or estrogen replacement therapy, smoking, consumption of alcohol or drugs, or performance of endurance training shortly before admission. Considering that menstrual status may influence immunity, it was necessary for participants to be neither ovulating nor menstruating. A structured clinical interview was conducted previous to the psychological questionnaire. Women showing depressive symptoms were excluded from the study. All participants gave their written consent for the use of their blood samples for academic research. All procedures were carried out according to the Declaration of Helsinki. Following the conduct of the psychological questionnaire (Spanish version), blood samples (12 ml of peripheral blood drawn by vein puncture) were collected from 9:00 am to 10:00 am (in tubes with citrate; BD Vacutainer

Systems) to avoid circadian variations on immune parameters.

Perceived Scale Stress (PSS). Psychological stress was measured using the Perceived Stress Scale (PSS-10), a 10-item questionnaire used to elicit an individual's evaluation of stressful experiences in the past month. The responses are rated on a Likert-type scale from 0 to 4 (0 = never, 1 = almost never, 2 = sometimes, 3 = fairly often, 4 = very often). Individual scores can range from 0-40 with higher scores indicating higher perceived stress. Scores ranging from 0-13 would be considered low perceived stress. Scores ranging from 14-26 would be considered as moderate and scores ranging from 27-40 would be considered as high perceived stress levels. Reliability and internal validity have been reported as high with α from .84 to .86 (Cohen et al. 1983; Lee 2012).

Hormone assays. Plasma cortisol was determined by using a Cortisol ELISA kit (ADI-900-071, Enzo Life Sciences, UK) and plasma DHEA-S was quantified by a DHEA-S ELISA kit (ab108669, Abcam, UK).

Analysis of immune function parameters

Isolation of neutrophils and lymphocytes. Neutrophils and lymphocytes cells were isolated from whole blood following a previously described method (Martínez de Toda et al. 2016), using 1.119 and 1.077 density Hystopaque (Sigma-Aldrich, Spain) for neutrophil and lymphocyte separation, respectively. Collected cells (95% of viability determined using trypan blue staining) were adjusted to the corresponding final concentrations for the development of each assay.

Chemotaxis. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 cells (neutrophils or lymphocytes)/ml in Hank's medium and placed into a Boyden chamber. The number of cells that migrated towards formyl-Met-Leu-Phe were counted and expressed as the Chemotaxis Index, as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Phagocytosis. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 neutrophils/ml in Hank's medium and placed into migration inhibition factor (MIF) plates for 30 min. After washing, latex beads were added into the plates and the number of latex beads ingested by 100 macrophages were counted and expressed as the Phagocytic Index, as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Natural killer cytotoxicity. Cell suspensions were adjusted to 10^6 lymphocytes/ml in RPMI 1640 medium and placed into 96-well plates. Human K-562 lymphoma cells were added into

wells and Natural killer activity was assessed by quantifying lactate dehydrogenase released into the medium (Cytotox 96 TM Promega, Germany). The results were expressed as the percentage of tumor cells killed (% lysis), as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Lymphoproliferative capacity. Cell suspensions were adjusted to 0.5×10^6 lymphocytes/ml in RPMI 1640 supplemented with medium supplemented with fetal bovine serum and placed into 96-well plates. The mitogen Phytohemagglutinin (PHA) or complete medium was added into wells and incubated for 48h. Then, ^3H -thymidine was also added and incubated for 24h. ^3H -thymidine uptake was quantified in a beta counter both in basal and stimulated conditions and results were expressed as lymphoproliferation capacity (%), 100% being the counts per minute (cpm) in basal conditions, as previously described (Martínez de Toda et al. 2016).

Determination of redox parameters

Whole blood cells. Whole blood cells (including erythrocytes and total leukocytes) were obtained as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). Aliquots of peripheral blood were diluted 1:1 in RPMI 1640 (Gibco, Canada) and were incubated for 4 h at 37°C in a saturated atmosphere of humidity and CO_2 . After centrifugation at 900g 10 min, plasma was removed and the whole blood cell pellets were stored at -80°C until used.

Superoxide dismutase activity. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured using a quantitative colorimetric assay kit (EnzyChrom™ ESOD-100, BioAssay Systems, Hayward, CA). Whole blood pellets were diluted (1:50) into diluent provided by the kit. 20 μL of each sample were dispensed into 96-well plates. After addition of xanthine oxidase, xanthine oxidase enzyme and water soluble tetrazolium (WST-1) as a dye, reaction took place for 60 min and absorbance was measured at 440 nm. Results were expressed as units (U) SOD/mg protein.

Glutathione peroxidase activity. Whole blood cells were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4 50 mM). Then, they were sonicated and supernatants (1:30) were used for the enzymatic reaction together with cumene hydroperoxide as a substrate as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). Oxidation of NADPH was measured at 340 nm. The results were expressed as U of glutathione peroxidase activity/mg protein.

Glutathione reductase activity. Whole blood cells were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4 50 mM). Then, they were sonicated and supernatants (1:5) were used for the enzymatic reaction together with GSSG 80 mM as substrate, as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). Oxidation of NADPH was measured at 340 nm. The results were expressed as U of glutathione reductase activity/mg protein.

Glutathione concentration. Whole blood cells were resuspended in phosphate buffer (pH 8 50 mM EDTA 0.1 M). Then, they were sonicated and supernatants were used for the quantification of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione by the reaction capacity that GSSG and GSH have with o-phthalaldehyde at pH 12 and pH 8, respectively, resulting in the formation of a fluorescent compound measured at 420 nm, as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). Results were expressed as nmol of GSSG and GSH per milligram of protein. Moreover, the GSSG/GSH ratio was calculated for each sample.

Malondialdehyde (MDA) concentration. Quantification of malondialdehyde (MDA) was achieved using the commercial kit “Lipid peroxidation (MDA) Assay Kit” (Biovision, USA). Whole blood cells were resuspended in 300 µl MDA lysis buffer (containing BHT 0.1mM), sonicated and centrifuged at 13000g for 10 min. Supernatants were collected, mixed with thiobarbituric acid (TBA) and incubated in a water bath at 95°C for 60 min. Then, samples were centrifuged, supernatants collected and absorbance was measured at 532 nm, as previously described (Martínez de Toda et al. 2019). Results were expressed as nmol MDA/mg protein.

Determination of inflammatory parameters

Cytokine measurement. Basal and LPS-stimulated plasmas from whole blood after incubation of 4 hours, were obtained and IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10 and IL-4 were measured simultaneously by multiplex luminometry (Beadlyte mouse multiplex cytokine detection system, HSTCMAG-28SK-05, Deltaclon, Spain).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in SPSS IBM, version 21.0 (SPSS, Chicago, USA). All tests were two-tailed, with a significant level of $\alpha=0.05$. Normality of the samples and homogeneity of the variances were checked by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Differences between groups were studied by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc test analysis. The Tukey test was used for post-hoc comparisons when variances were homogeneous, whereas its counterpart Games-Howell was used when variances were not homogeneous. In addition, Pearson's correlation coefficient was calculated using the Perceived Stress Scale (PSS) scores and the estimated biological age of each subject.

Results

The main characteristics of the three groups of women enrolled in this study are reported in Table 1, including PSS score ranges and averages of each group. The three groups comprised women from the same ages. The group of high perceived stress showed higher cortisol concentration in plasma ($P < 0.05$), lower concentration of dehydroandrosterona-sulfate (DHEA-S) ($P < 0.001$) and higher cortisol/DHEA-S ratio ($P < 0.01$) compared to the group of low perceived stress.

	Low perceived stress	Moderate perceived stress	High perceived stress
N	23	14	12
Age (years)	40 ± 5	42 ± 7	39 ± 8
PSS	0-13	14-26	27-56
PSS average	9.2 ± 1.6	20.9 ± 3.7	34.9 ± 6.2
Cortisol (nmol/L)	222.0 ± 136	211.4 ± 138.0	325.0 ± 128.6 *
DHEA-S (nmol/L)	26.7 ± 16.5	20.16 ± 12.7	4.42 ± 4.86 ***
Cortisol/DHEA-S ratio	20.8 ± 24.2	33.8 ± 18.3	57.5 ± 21.3 **

Table 1. Demographic data, perceived stress score, cortisol (nmol/L), DHEA-S (nmol/L) and Cortisol/DHEA-S ratio from three experimental groups: low, moderate and high perceived stress. PSS: Perceived Stress Scale. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ with respect to the group of women with low perceived stress levels.

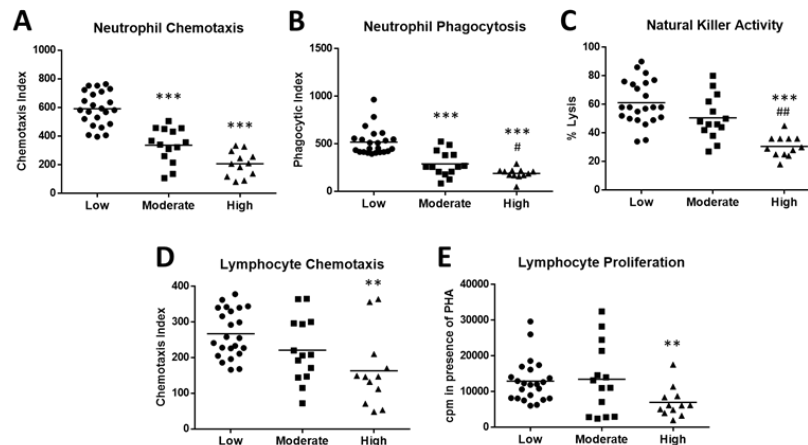


Figure 1. Immune function parameters in middle-aged women with low, moderate or high stress perception. A) Neutrophil Chemotaxis; B) Neutrophil Phagocytosis, C) Natural Killer Activity, D) Lymphocyte Chemotaxis, E) Lymphocyte Proliferation. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$ with respect to the low perceived stress group. #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$ with respect to the moderate perceived stress group.**

The results regarding immune function (Figure 1) showed that the group of women with high perceived stress displayed lower neutrophil chemotaxis and phagocytosis, natural cytotoxic activity ($P < 0.001$) as well as lymphocyte chemotaxis and proliferation ($P < 0.01$) compared to the group of women with low perceived stress. This group with high perceived stress also showed lower neutrophil phagocytosis and natural cytotoxic activity ($P < 0.05$; $P < 0.01$; respectively) with respect to the group with moderate perceived stress. In addition, the group of women with moderate perceived stress showed lower neutrophil chemotaxis and phagocytosis ($P < 0.001$) compared to the group with low perceived stress.

Given that these immune function parameters have been validated as markers of the biological age ([Martínez de Toda et al. 2016](#)), the individual biological age of each woman was estimated through a mathematical model which takes into account neutrophil chemotaxis and phagocytosis, lymphocyte chemotaxis, Natural Killer activity as well as lymphoproliferation ability. Thus, the existing relationship between the estimated biological age of each woman and her PSS score was investigated. It was found that there is a positive correlation between the degree of perceived stress and biological age (Pearson's correlation coefficient = 0.820; $P < 0.001$).

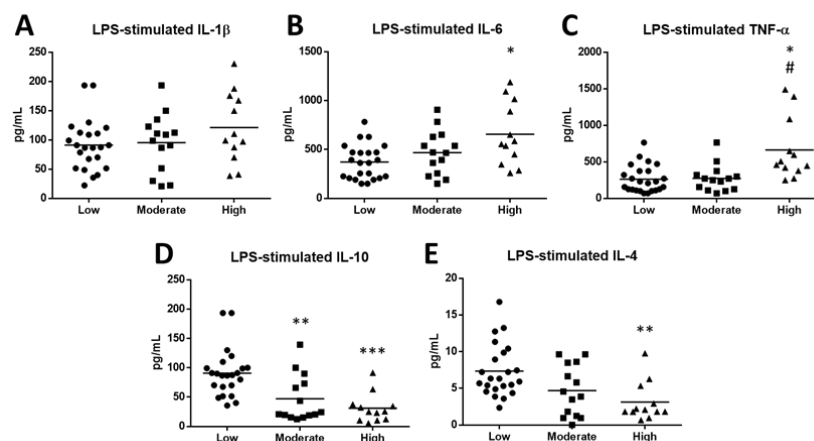


Figure 2. LPS-stimulated cytokine release from whole blood from middle-aged women with low, moderate or high levels of stress perception. A) IL-1 β release; B) IL-6 release; C) TNF- α release; D) IL-10 release; E) IL-4 release. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$ with respect to the low perceived stress group. #: $P < 0.05$ with respect to the moderate perceived stress group.**

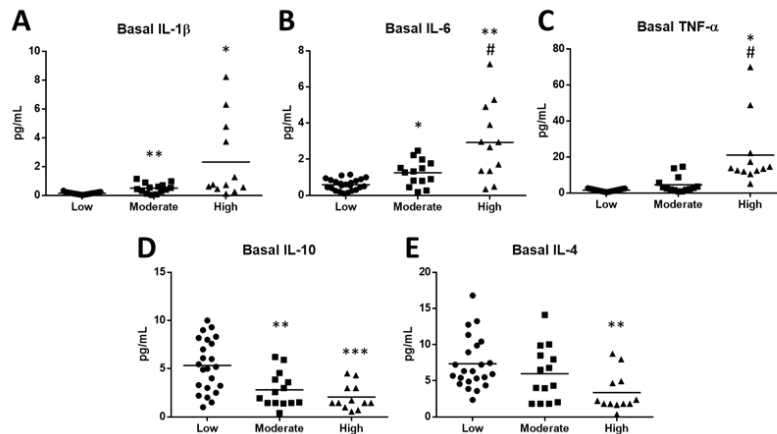


Figure 3. Basal cytokine release from whole blood from middle aged-women with low, moderate or high levels of stress perception. A) IL-1 β release; B) IL-6 release; C) TNF- α release; D) IL-10 release; E) IL-4 release. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$ with respect to the low perceived stress group. #: $P < 0.05$ with respect to the moderate perceived stress group.**

In addition, the functional capacity of immune cells was evaluated by measuring cytokine release in response to LPS stimulation in whole blood (Figure 2). It was found that the group of women with high levels of stress perception had a higher release of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$) and lower of IL-10 ($P < 0.001$) and IL-4 ($P < 0.01$) than the group of women with low perceived stress. Moreover, women with high levels of perception of stress showed higher TNF- α ($P < 0.05$) than the group of women with moderate stress perception. However, the group of women with moderate perceived stress only showed a lower concentration of IL-10 ($P < 0.01$) than the group of women with low perceived stress.

Moreover, basal cytokine release from whole blood was also investigated, as an indicator of sterile inflammation (Figure 3). It was found that the group of women with high levels of stress perception showed higher basal release of IL-1 β ($P < 0.05$), IL-6 ($P < 0.01$), TNF- α ($P < 0.05$) and lower basal release of IL-10 ($P < 0.001$) and IL-4 ($P < 0.01$) than the group of women with low perceived stress, and higher basal release of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$) than the group of women with moderate perceived stress. In addition, the group of women with moderate perceived stress also showed higher basal release of IL-1 β ($P < 0.01$) and IL-6 ($P < 0.05$) and lower basal release of IL-10 ($P < 0.01$) than the group of women with low stress perception.

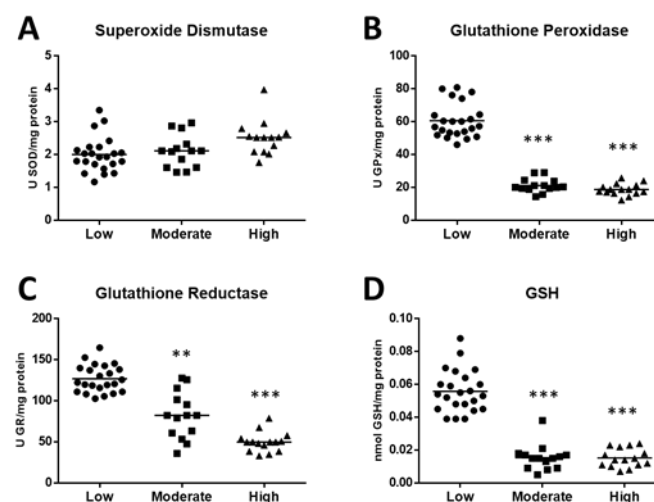


Figure 4. Antioxidant parameters in whole blood cells from middle-aged women with low, moderate or high stress perception. A) Superoxide Dismutase activity; B) Glutathione Peroxidase activity; C) Glutathione Reductase activity; D) Reduced Glutathione (GSH) concentration. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$ with respect to the low perceived stress group.**

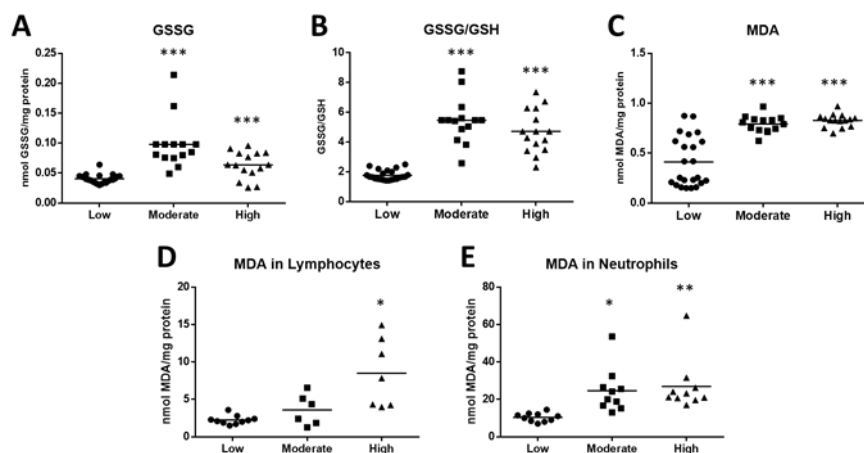


Figure 5. Oxidant parameters in whole blood and isolated immune cells from middle-aged women with low, moderate or high stress perception. A) Oxidized Glutathione (GSSG) concentration in whole blood cells; B) GSSG/GSH ratio in whole blood cells; C) Malondialdehyde (MDA) concentration in whole blood cells; D) MDA concentration in isolated lymphocytes; E) MDA concentration in isolated neutrophils. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$ with respect to the low perceived stress group.**

With respect to the antioxidant defences in whole blood cells (Figure 4), the group of women with high perceived stress displayed lower GPx and GR activities as well as GSH concentrations ($P < 0.001$) compared to the group with low perceived stress. In addition, the group with moderate stress perception also showed lower GPx and GR activities as well as GSH concentrations ($P < 0.01$ for GR; $P < 0.001$ for GPx activity and GSH concentration) than the group with low stress perception.

Regarding oxidant parameters in whole blood cells (Figure 5), both the groups of women with moderate and high perceived-stress showed higher GSSG concentrations, GSSG/GSH ratios and MDA concentrations ($P < 0.001$) than the group of women with low perceived stress. In addition, the peroxidative damage marker, malondialdehyde concentration, was also investigated in isolated immune cell types, in lymphocytes and in neutrophils. The results show that, in general, neutrophils have higher MDA concentration than lymphocytes. When focusing on the differences within degrees of perceived-stress, it was found that the group of women with high perceived-stress levels show higher MDA concentrations both in lymphocytes and in neutrophils compared to the group of low perceived stress ($P < 0.05$; $P < 0.01$; respectively). However, the group of women with moderate perceived-stress levels only have higher MDA concentrations in neutrophils compared to the group of low perceived stress ($P < 0.05$).

Discussion

The notion that our interpretation of events is crucial to the physiological response to them has been known for several years. [Cohen et al. \(1997\)](#) described a model of the process through which life events and stressors generate a multi-stage “stress response”. Thus, the stress response is initiated by an assessment of the threatening nature of the stressors, in which factors such as individual personality, personal experiences, resources, coping mechanisms and available social support play a decisive role ([Afshar et al. 2015](#); [De La Fuente 2018](#)). Despite the fact that most studies which link stressors and physiological response (or disease) acknowledge the importance of the individual’s subjective appraisal of the event ([Kristensen 1996](#), [Schwartz et al. 1996](#), [Cohen et al. 1997](#)), studies focused on the association between perceived stress and biological indicators are scarce and conflicting ([Goldman et al. 2005](#)). To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate that self-reported perceived stress, independently of the type, intensity and duration of the stressor, has a profound impact on the function of immune cells as well as on the oxidative and inflammatory state of the individual and therefore, on the rate of aging. Given that the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal (HPA) axis is pivotal for immune system homeostasis, alterations on its fine-tuning have been associated with disease. HPA over-activation may increase susceptibility to infectious diseases such as influenza, whereas its repression may increase susceptibility to autoimmune diseases ([Bauer 2005](#)).

Two adrenal hormones, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and cortisol have been reported to be involved in this signalling displaying opposing effects on immune function (Butcher et al. 2005). In general, DHEA-S has been described as an enhancer of the immune function, whereas cortisol as a suppressive (Butford et al. 2008). Accordingly, chronic stress situations throughout cortisol release have been linked to an impaired NK activity, a lower lymphoproliferative capacity as well as to an impaired antibody production in response to vaccination (Herbert and Cohen, 1993; Kiecolt-Glaser et al. 1984; Cohen et al. 2001). Thus, the increased cortisol/DHEA-S ratio found in plasma from women experiencing moderate and high perceived stress levels compared to those with low stress perception, would explain their defective immune cell function. However, whereas high perceived-stress led to an evident deterioration of all immune functions analysed, moderate perceived stress only affected neutrophil functioning. This finding was at first surprising, given that neutrophils have been previously reported to be less sensitive to glucocorticoid suppressive actions (Saffar et al. 2011), although some other studies have found conflicting evidence (Hirsch et al. 2012). Nevertheless, when the peroxidative damage marker, malondialdehyde (MDA), was quantified in isolated immune cells, it was found that neutrophils but not lymphocytes from women with moderate perceived stress displayed increased MDA concentrations. Given that an appropriate function of immune cells relies on their adequate redox balance (De La Fuente and Miquel 2009), this could be the underlying reason for their defective functioning. In fact, neutrophils need to produce high oxidant compounds such as superoxide anion to perform an effective phagocytic process, which may justify why they show higher peroxidative damage than lymphocytes. The results obtained in the present study agree with results from previous studies, which show that phagocytes, both neutrophils in humans and macrophages in mice, are the type of immune cell that accumulate the most oxidative damage (Vida et al. 2017a; 2017b; Martinez de Toda et al. 2019).

Furthermore, since cytokines are essential modulators of interactions that regulate cell-mediated and humoral immunity, changes in their release could play a crucial role in the observed impairment of immune function. Accordingly, immune cells from women with moderate and high perceived stress, when challenged with an infection, mimicked with LPS, showed a higher release of pro-inflammatory cytokines and a lower release of anti-inflammatory, as previously reported

(Sribanditmongkol et al. 2015). In addition, with respect to basal cytokine release, which is an indicator of sterile inflammation (Bauer and De La Fuente 2016), women with moderate and high self-reported stress were found to display higher basal release of pro-inflammatory cytokines and lower of anti-inflammatory ones. These results agree with other studies in which higher pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α have been found in plasma from anxious women (Maes et al. 1998, Arranz et al. 2007). This unbalanced pro-inflammatory/anti-inflammatory ratio can have serious detrimental effects given that enhanced pro-inflammatory cytokine signalling may promote generation of reactive oxygen species (ROS) and lead to oxidative damage, since oxidative and inflammatory stress are very related processes (Vida et al. 2014; De la Fuente 2018). In the present study, it was demonstrated that both moderate and high perceived levels of stress were associated with lower antioxidant defences (GPx, GR activities and GSH concentrations) and higher oxidant parameters (GSSG and MDA concentrations as well as GSSG/GSH ratios) in whole blood cells, similar to those observed in elderly individuals (Martinez de Toda et al. 2019). These results agree with other studies, which have found a close relationship between perceived stress and oxidative DNA damage in urine (Shimano et al. 2018), oxidative DNA damage in leukocytes (Irie et al. 2001; Irie et al. 2003) and with isoprostane levels in plasma (Epel et al. 2004).

Furthermore, in the context of the neuroimmunoendocrine communication, an inadequate response to stress has been described as causing accelerated aging (Perna et al. 2015; De la Fuente 2018). Accordingly, chronically stressed individuals show an accelerated telomere shortening (Epel et al. 2004). Supporting this idea, in the present study, a positive correlation was found between perceived stress levels (PSS scores) and biological age (estimated through a mathematical model based on immune function parameters), even though all women included in the study belonged to the same age group (30-50 years old). Thus, it seems that the increased oxidative and inflammatory stress that takes place in women with moderate and high perceived stress, causes an immunosenescence and consequently, according to the oxidative-inflammatory theory of aging (De La Fuente and Miquel 2009), accelerates the aging rate of those subjects (De La Fuente 2018). A limitation of the study is that we did not take into account the objective nature or the magnitude of the stressors that the women included in the study were facing, which could be enormously different. However, an interesting study carried out in women, all subjected to the

same objective stressor, such as caring of a disabled spouse, found out that the final effects on health, did not rely on the nature of the stressor, which was the same, but rather on the perception and coping mechanism of the subjects facing that stress (Beach et al. 2000).

Altogether, the results from the present study demonstrate that an inadequate response to stress has a profound impact on the oxidative and inflammatory stress state as well as on the functional capacity of immune cells. Thus, the higher the perceived stress, the higher the oxidative and the inflammatory stress and the worse the immune function. In addition, high levels of perceived stress seem to be associated with an accelerated aging and, consequently, with a higher biological age, which (in the long term, if not treated) entails a shorter lifespan.

Funding: This work was supported by grants of FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union and of UCM-Research Group

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Afshar H, Roohafza HR, Keshteli AH, Mazaheri M, Feizi A, Adibi P (2015) The association of personality traits and coping styles according to stress level. *J Res Med Sci* 20(4):353–358.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M (2007) Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res* 62:1-8. doi: 10.1016/j.jpsychores.2006.07.030.
- Bauer ME (2005) Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress* 8: 69-83. doi: 10.1080/10253890500100240.
- Bauer ME, De La Fuente M (2016) The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 158:27-37. doi: 10.1016/j.mad.2016.01.001.
- Beach SR, Schulz R, Yee JL, Jackson S (2000) Negative and positive health effects of caring for a disabled spouse: longitudinal findings from the caregiver health effects study. *Psychol Aging* 15:259-271. <http://dx.doi.org/10.1037/0882-7974.15.2.259>.
- Bouayed J, Rammal H, Soulimani R (2009) Oxidative stress and anxiety. *Oxid Med Cell Longev* 2:63–67.
- Buford TW, Willoughby DS (2008) Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in aging: a brief review. *Appl Physiol Nutr Metab* 33(3):429-33. doi: 10.1139/H08-013.
- Butcher SK, Killampalli V, Lascelles D, Wang K, Alpar EK, Lord JM (2005) Raised cortisol:DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity. *Aging Cell* 4:319-24. doi: 10.1111/j.1474-9726.2005.00178.x.
- Cohen S, Kamarch T, Mermelstein R (1983) A global measure of perceived stress. *J Health Soc Behav* 24: 385-96. doi: 10.2307/2136404.
- Cohen S, Kessler RC, Gordon LU (1997) *Measuring stress: A guide for health and social scientists*. New York. Oxford University Press.
- Cohen S, Miller GE, Rabin BS (2001) Psychological stress and antibody response to immunization: A critical review of the human literature. *Psychosom Med* 63: 7–18.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M (2014) The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr Pharm Des* 20:4608-28. doi: 10.2174/1381612820666140130205822.
- De la Fuente M (2018) Oxidation and Inflammation in the Immune and Nervous Systems, a Link Between Aging and Anxiety. In: Fulop T., Franceschi C., Hirokawa K., Pawelec G. (eds) *Handbook of Immunosenescence*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1_115-1
- De la Fuente M, Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 15:3003–26. doi: 10.2174/138161209789058110.
- Del Rey A, Besedovsky HO (2017) Immune-Neuro-Endocrine Reflexes, Circuits, and Networks: Physiologic and Evolutionary Implications. *Front Horm Res* 48:1-18. doi: 10.1159/000452902.
- Dhabhar FS (2009) Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16:300–317. doi: 10.1159/000216188.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17312-5. doi: 10.1073/pnas.0407162101.

- Forlenza MJ, Miller GE (2006) Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med* 68:1-7. doi: 10.1097/01.psy.0000195780.37277.2a.
- Gingrich JA (2005) Oxidative stress is the new stress. *Nat Med* 11:1281-1282. doi: 10.1038/nm1205-1281.
- Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH (2018) A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci* 12:127. doi:10.3389/fnbeh.2018.00127.
- Goldman N, Gleib DA, Seplaki C, Liu IW, Weinstein M (2005) Perceived stress and physiological dysregulation in older adults. *Stress* 8:95-105. doi: 10.1080/10253890500141905.
- Herbert TB, Cohen S (1993) Stress and immunity in humans: A meta-analytic review. *Psychosom Med* 55:364-79.
- Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Lavoie JP (2012) Neutrophils Are Not Less Sensitive Than Other Blood Leukocytes to the Genomic Effects of Glucocorticoids. *PLoS One* 7:44606. doi: 10.1371/journal.pone.0044606.
- Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H (2003) Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1014-1018. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.105.
- Irie M, Asami S, Nagata S, Miyata M, Kasai H (2001) Relationships between perceived workload, stress and oxidative DNA damage. *Int Arch Occup Environ Health* 74:153-157. doi: 10.1007/s004200000209.
- Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R (1984) Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med* 46: 7-14.
- Kristensen TS (1996) Job stress and cardiovascular disease; a theoretic critical review. *J Occup Health Psychol* 1:246-260. http://dx.doi.org/10.1037/1076-8998.1.3.246.
- Lee EH (2012) Review of the psychometric evidence of the perceived stress scale. *Asian Nurs Res (Korean Soc Nurs Sci)* 6:121-7. doi: 10.1016/j.anr.2012.08.004.
- Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K (2007) Mid-life stress is associated with both up- and down-regulation of markers of humoral and cellular immunity. *Stress* 10:351-61. doi: 10.1080/10253890701379023
- Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, Kenis G, Bosmans E, De Meester I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpe S, Smith RS (1998) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10:313-8. https://doi.org/10.1006/cyto.1997.0290.
- Mariotti A (2015) The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain-body communication. *Future Sci OA* 1:FSO23. doi:10.4155/fso.15.21.
- Martinez de Toda I, Garrido A, Vida C, Gomez-Cabrera MC, Viña J, De la Fuente M (2018) Frailty Quantified by the "Valencia Score" as a Potential Predictor of Lifespan in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 73:1323-1329. doi: 10.1093/gerona/gly064.
- Martinez de Toda I, Maté I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M (2016) Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging* 8:3110-3119. doi:10.18632/aging.101116.
- Martínez de Toda I, Vida C, Garrido A, De la Fuente M (2019) Redox parameters as markers of the rate of aging and predictors of life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. doi: 10.1093/gerona/glz033.
- Miller GE, Cohen S, Ritchey AK (2002) Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol* 21:531-41. http://dx.doi.org/10.1037/0278-6133.21.6.531.
- Perna G, Iannone G, Alciati A, Caldirola D (2015) Are Anxiety Disorders Associated with Accelerated Aging? A Focus on Neuroprogression. *Neural Plast* 2016:8457612. doi: 10.1155/2016/8457612.
- Remor E (2006) Psychometric Properties of a European Spanish Version of the Perceived Stress Scale (PSS). *The Spanish Journal of Psychology* 9:86-93. https://doi.org/10.1017/S1138741600006004.
- Rohleder N (2012) Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems. *Psychoneuroendocrinology* 37: 307-316. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.12.015.
- Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS (2011) The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets* 12:556-62. doi:10.2174/138945011794751555.

Salim S (2016) Oxidative stress: a potential link between emotional wellbeing and immune response. *Curr Opin Pharmacol* 29:70-76. doi: 10.1016/j.coph.2016.06.006.

Salim S, Asghar M, Taneja M, Hovatta I, Chugh G, Vollert C, Vu A (2011) Potential Contribution of Oxidative Stress and Inflammation to Anxiety and Hypertension. *Brain Res* 1404:63-71. doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.024.

Schwartz JE, Pickering TG, Landsbergis PA (1996) Work-related stress and blood pressure: Current theoretical models and considerations from a behavioral medicine perspective. *J Occup Health Psychol* 1(3):287-310. <http://dx.doi.org/10.1037/1076-8998.1.3.287>.

Seegerstrom SC, Miller GE (2004) Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 130:601-630. doi:10.1037/0033-2909.130.4.601.

Shimano C, Hara M, Nishida Y, Nanri H, Horita M, Yamada Y, Li YS, Kasai H, Kawai K, Higaki Y, Tanaka K (2018) Perceived Stress, Depressive Symptoms, and Oxidative DNA Damage.

Psychosom Med 80:28-33. doi: 10.1097/PSY.0000000000000513.

Sribanditmongkol V, Neal JL, Patrick TE, Szalacha LA, McCarthy DO (2015) Effect of perceived stress on cytokine production in healthy college students. *West J Nurs Res* 37:481-93. doi: 10.1177/0193945914545658.

Vida C, Gonzalez EM, De la Fuente M (2014) Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des* 20:4656-78. doi: 10.2174/1381612820666140130201734.

Vida C, Martínez de Toda I, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M (2017b) Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox biol* 12:423-437. doi:10.1016/j.redox.2017.03.005.

Vida C, Martínez de Toda I, Garrido A, Carro E, Molina JA, De la Fuente M (2017a) Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Front Immunol* 8:1974. doi:10.3389/fimmu.2017.01974.

DECISION LETTER

Your manuscript (19-0198R2) has now been accepted in the Journal of Alzheimer's Disease. There is a link below which includes this decision letter and any additional comments from the reviewers. Please click it to confirm receipt of this letter.

In keeping with the policy of JAD, you are cordially invited to become an Associate Editor of the journal. More information about the role of an Associate Editor is available at our website (<http://www.j-alz.com/editorrole>); our structure is quite unique and centered on the open dissemination of novel ideas. If you choose to accept, your one-year term would begin January 1, 2020 and is renewable by future submissions or handling of manuscripts.

We look forward to a positive response.

We require financial disclosure statements from all authors for each accepted manuscript. Please log on to our online disclosure system (<http://www.j-alz.com/node/add/disclosure>) and enter your manuscript number (19-0198R2). Select your name from the pull down list and complete the form. Please have all of your co-authors complete the form as well.

Additionally, please complete the Author Publication Fee Payment form (<http://www.iospress.nl/journal-fee-form/?id=5&journal=29297>). More information is available at our website: <http://www.j-alz.com/fees>. If you experience any problems with the payment, please contact Authorfees@iospress.nl.

After acceptance, any additions or deletions to the list of authors MUST be approved by the Editor-in-Chief, and all authors on the manuscript must also sign off on the changes. Corrections to the title after acceptance should also be sent to the editorial office so the disclosure listing can be updated. Please contact the Managing Editor (editorial@j-alz.com) for more information.

Sincerely,

Jesus Avila
Journal of Alzheimer's Disease

Altered redox state in whole blood cells from patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease

Irene Martínez de Toda^{1,2}, Lara Miguélez¹, Carmen Vida^{1,2}, Eva Carro³, Mónica De la Fuente^{1,2}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

²Institute of Biomedical Research Hospital 12 Octubre (imas12), Madrid, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

Running title: Whole blood redox markers in Alzheimer

Corresponding Author: Mónica De la Fuente, PhD, MD, Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. Telephone number: 91 394 4989. E-mail: mondela@bio.ucm.es

Abstract

Oxidative stress plays an essential and early role in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Alterations in the redox state in AD and in mild cognitive impairment (MCI) patients appear in the brain and at peripheral level. Given that it is easier to study the latter, most of the research has been focused on plasma. However, the analysis of redox parameters in whole blood cells (including erythrocytes and leukocytes) has not really been investigated. Moreover, the association of these parameters with Mini-Mental State Examination (MMSE) clinical scores, has scarcely been studied. Therefore, the aim of the present work was to analyze several redox markers in whole blood cells from male and female MCI and AD patients. Antioxidant (Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) and Reductase (GR) activities, and reduced glutathione (GSH) concentration) together with oxidant parameters (oxidized glutathione (GSSG) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were investigated using MCI and AD (10 women and 10 men in each group) and their age-matched control groups (15 women and 15 men). The results show an altered redox state in whole blood cells from AD patients (higher CAT, GSSG/GSH, TBARS and lower GPx, GR, GSH). Some of these redox parameters are already affected in MCI patients (higher TBARS and lower GPx and GR activities) in both sexes and, consequently, they could be used as markers of prodromal AD. Since GR, GSH, GSSG and GSSG/GSH were found to be associated with MMSE scores, they seem to be useful clinically to monitor cognitive decline in AD progression.

Keywords: cognitive dysfunction, neurodegenerative diseases, preclinical markers, oxidative stress, antioxidants, oxidants

Introduction

Due to the increasing average lifespan, the clinical relevance of Alzheimer Disease (AD) is exponentially rising and is expected to become a pandemic and public health burden. Thus, it is estimated that the prevalence of AD may reach >115 million worldwide by 2050 [1]. The sporadic form, which is the most common cause of AD (>95% of cases) has a late age of onset and it is strongly associated with aging [2, 3]. One of the main obstacles of a potential AD cure is that it is only diagnosed in later stages of the disease, in which there is already irreversible brain damage. However, numerous longitudinal

follow-up studies clearly demonstrated that AD dementia is preceded by a long asymptomatic (preclinical) phase followed by a transitional stage with mild cognitive impairment (MCI) [4-6]. Thus, this intermediate stage offers an important opportunity for possible diagnosis, prevention and therapeutic interventions. It is now recognized that only a combination of biomarkers will define a patient-specific signature to diagnose AD in the future [7]. Although the accumulation of amyloid and tau proteins is considered the core pathologic hallmark for AD, other factors such as oxidative stress and inflammation, contribute enormously to its complex pathophysiology. In this context,

it is now well established that oxidative stress plays a pivotal role in the pathophysiology and the progression of AD. Nunomura et al. [8] showed that oxidative stress in brain precedes the development of the neuropathological hallmarks of AD such as the extracellular senile plaques formed by amyloid- β peptide and the neurofibrillary tangles consisting of abnormally phosphorylated tau protein. In fact, some evidence has suggested that the β -amyloid deposition in certain neurons may be considered an effort to protect these cells against damage due to oxidative stress [9-11]. A β deposition has also been associated with neuronal lipid, protein and DNA oxidation in animal models of AD [12-14], whereas in humans, oxidative damage to biomolecules has also been reported in the brain of both AD and MCI patients [15, 16]. In addition, several studies have shown that the oxidative alterations in AD and in MCI patients are not only limited to the brain but they have also been detected in the blood compartment [17-19]. Nevertheless, both establishing the right pattern of redox markers to analyze as well as choosing the most appropriate sample type remain a challenge in AD. Most of the studies have been focused on the search for redox markers in plasma or serum [19, 20]. However, the redox status of erythrocytes is essential for adequate oxygen delivery to the whole body. In fact, an impaired oxygen delivery to the brain causing neuronal AD dysfunction, has been considered an important factor in AD [21]. Moreover, the redox state of immune cells has been shown to be crucial for their adequate defensive functioning [17]. Actually, a higher oxidative stress has been linked to a premature immunosenescence in leukocytes from AD patients and to an uncontrolled higher release of pro-inflammatory mediators which also contribute to AD pathology [17].

Therefore, in order to identify non-invasive redox markers that can be used for an early diagnosis of AD, we decided to investigate several parameters of oxidative stress in whole blood cells (containing erythrocytes and leukocytes). Thus, antioxidant enzyme activities and compounds (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and reduced glutathione concentrations) as well as pro-oxidant compounds (oxidized glutathione and TBA-reactive substances) were investigated in whole blood cells from MCI and AD patients. In addition, differences by sex were also considered. Moreover, the relationship between each of the redox parameters studied and the degree of cognitive performance assessed by the Mini-Mental State Examination (MMSE) were also investigated.

Materials and Methods

Subjects and clinical classification. A total of 70 volunteers were selected and divided into three experimental groups: control subjects (n=30), mild cognitive impairment (MCI) patients (n=20) and mild Alzheimer disease (mAD) patients (n=20). All subjects were recruited by the Neurology Department of the Hospital 12 Octubre of Madrid. The AD diagnosis was established according to the guidelines of the National Institute on Neurological Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINDS-ADRDA) [22]. For MCI subjects the following inclusion criteria applied: (a) memory complaint, corroborated by an informant; (b) objective memory impairment detected by neuropsychological evaluation; (c) largely intact general cognitive function; (d) essentially preserved activities of daily living; and (e) non demented [23]. Disease severity and normal cognitive function was determined by a clinician's judgment based on a structured interview with the patient and the results of the Spanish Version of the Clinical Dementia Rating (CDR) and the Mini-Mental State Examination (MMSE) tests [24]. The MCI group included both amnesic and non-amnesic patients. In both MCI men and women, the proportion of amnesic subjects was 40%. Given that no statistically significant differences in the markers investigated were found between amnesic and non-amnesic patients, data are shown together. All subjects included in the study had at least, a basic education and they were able to read and write. Inclusion criteria for the age-matched control group were no memory complaints and with 0 score on the Clinical Dementia Rating (CDR = 0) randomly chosen from the general population. Demographic details and MMSE test results of the different study groups are summarized in Table 1. All subjects were subjected to a clinical survey and physical examination. Those with diabetes, cardiovascular disease, cancer or chronic inflammatory diseases were not included in this study. All procedures were carried out according to the Declaration of Helsinki, and approval was obtained from the corresponding Research Ethic Committees. Written informed consent was obtained from all participants or representatives.

Extraction of human blood samples. Blood samples were obtained using sodium citrate as anticoagulant. Whole blood cells (including erythrocytes and total leukocytes) were obtained as previously described [25]. Aliquots of peripheral blood were diluted 1:1 in RPMI 1640 (Gibco, Canada) and were incubated 4 h at 37°C

in a saturated atmosphere of humidity and CO₂. After centrifugation at 900g 10 min, plasma was removed and whole blood cell pellets were stored at -80°C until used.

Superoxide dismutase activity. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured using a quantitative colorimetric assay kit (EnzyChrom™ ESOD-100, BioAssay Systems, Hayward, CA).

Catalase activity. Catalase (CAT) activity was quantified as previously reported by Beers and Sizer [26] with some modifications [25]. Whole blood cells were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4 50mM). Then, they were sonicated, centrifuged at 3200g 20 min and supernatants were obtained. H₂O₂ (14mM) was used as substrate. Supernatants were diluted 1:1000 prior the assay. The reaction was calculated by following the absorbance decline at 240 nm over 80 seconds. In the same samples, protein concentration was calculated (BCA protein assay kit (Sigma-Aldrich) and the results are expressed as units (U) of catalase activity/milligram of protein (U CAT/mg protein).

Glutathione peroxidase activity. Glutathione peroxidase (GPx) activity was analyzed by using a previous method [27] with some modifications [25]. Whole blood pellets were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4 50 mM). Then, they were sonicated and after centrifugation at 3200g at 4 °C for 20 min, supernatants were collected. Human supernatants were diluted 1:30 prior the assay. Cumene hydroperoxide was used as substrate (cumene-OOH; Sigma). The activity was followed measuring the absorbance decline at 340 nm over 5 min. Protein concentration was calculated as described above. The results are expressed as units (U) of glutathione peroxidase activity/milligram of protein (U GPx/mg protein).

Glutathione reductase activity. Glutathione reductase (GR) activity was analyzed following a method previously described [28] with some modifications [25]. Whole blood cells were resuspended in oxygen-free phosphate buffer (pH 7.4 50 mM). Then, they were sonicated, centrifuged at 3200g at 4 °C 20 min and supernatants were collected. Human supernatants were diluted 1:5 prior the assay. Oxidized glutathione (GSSG) (80 mM) was used as substrate and, by following the absorbance decline at 340 nm over 5 min, the activity was calculated. Protein concentration was evaluated as described above. The results are expressed as units (U) of Glutathione reductase/per milligram of protein (U GR/mg protein).

Glutathione concentration. Both reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione

(GSSG) were measured following a fluorometric assay [29] with some modifications [25]. This method relies on the reaction capacity that glutathione (both GSSG and GSH) shows with o-phthalaldehyde (OPT), at pH 12 and pH 8, respectively, forming a fluorescent compound. Whole blood cells were resuspended in phosphate buffer (pH 8 50 mM EDTA 0.1 M). Then, samples were sonicated, 7.5 µL of HClO₄ (60%) were added and they were centrifuged 10 min at 9500g. 10 µL from supernatants were dispensed into 96 black plates. For GSH quantification, OPT (1 mg/mL) was dispensed into the wells. For the quantification of GSSG, N-ethylmaleimide (NEM, 0.04 M) was dispensed into each well and after a 30 min incubation, NaOH (pH 12) and OPT were added. After 15 min incubation with OPT, fluorescence was measured at 420 nm. Protein concentration was calculated as described above. Results are expressed as nmol of GSSG/mg protein or GSH/mg protein. In addition, GSSG/GSH ratio was calculated for each sample.

TBA-reactive substances (TBARS) concentration. Quantification of TBARS was achieved using the commercial kit “Lipid peroxidation (MDA) Assay Kit” (Biovision, USA). To prevent further peroxidation of lipids during the preparation of the sample or during the heating step, the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) was added to the lysis buffer at a final concentration of 0,1 mM. Briefly, peritoneal leukocytes and whole blood cells were resuspended in 300 µl MDA lysis buffer (containing BHT), sonicated and centrifuged at 13000g for 10 min. Supernatants were collected, mixed with thiobarbituric acid (TBA) and incubated in a water bath at 95°C for 60 min. Then, after centrifugation at 13000g 10 min, supernatants were obtained, added into a 96-well plate and absorbance at 532nm was measured. Protein concentrations were calculated as described above. Because TBA reacts with more aldehydes than malondialdehyde, we will refer to the results obtained as TBA-reactive substances, even though the concentrations were related to a standard curve using malondialdehyde alone, and therefore, the results are expressed as nmol MDA/mg protein.

Statistical Analysis. Statistical analysis of the results was performed with SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA) software. For comparison of variables, the nonparametric Kruskal-Wallis test was carried out followed by Mann-Whitney U test to determine significant differences between groups. The Pearson correlation coefficient was used to test for correlation between parameters. Two-sided P<0.05 was considered the minimum level of significance.

	Control	MCI	AD
N (F/M)	30 (15/15)	20 (10/10)	20 (10/10)
Age (years)	72.00 - 76.00	74.00 - 76.75	72.00 - 76.00
MMSE score	n.e.	24.00 - 26.00	17.00 - 24.00
CDR score	0	0.5	1
ApoE34/ApoE33	1/29	7/13	6/14

Table 1. Demographic data and cognitive performance of control group, mild cognitive impairment (MCI) patients and Alzheimer's disease (AD) patients. F: female; M: male; MMSE: Mini-Mental State Examination; CDR: Clinical Dementia Rating. Data of age and MMSE score are reported as the first and third quartile, respectively. All control individuals had a CDR score of 0, MCI subjects of 0.5 and AD patients of 1. N.e = not evaluated.

Results

The main characteristics of the three groups of individuals enrolled in this study are reported in Table 1. There was the same proportion of men and women in each group. The three groups comprised subjects from the same age interval. Compared to healthy controls, a higher proportion of patients with MCI and AD were ApoE34 carriers. The results regarding antioxidant parameters are shown in Figure 1. AD patients showed higher CAT activity ($P < 0.001$) and lower GPx and GR activities and GSH concentration ($P < 0.001$) than age-matched controls, and even lower GPx activity and GSH concentration than MCI patients ($P < 0.01$). MCI

patients also showed higher CAT activity ($P < 0.001$) and lower GPx and GR activities ($P < 0.001$) than controls. With respect to oxidant parameters (Figure 2), AD patients showed higher GSSG, GSSG/GSH ratio and TBARS concentrations ($P < 0.05$ for GSSG; $P < 0.001$ for GSSG/GSH and TBARS) than age-matched controls. MCI patients showed higher GSSG/GSH ratio ($P < 0.01$) and TBARS concentration ($P < 0.001$) than controls. Within MCI and AD groups, subjects were further classified depending on the ApoE genotype, although no non-statistically significant differences were found in any redox marker due to the presence of ApoE33 or 34 genotype.

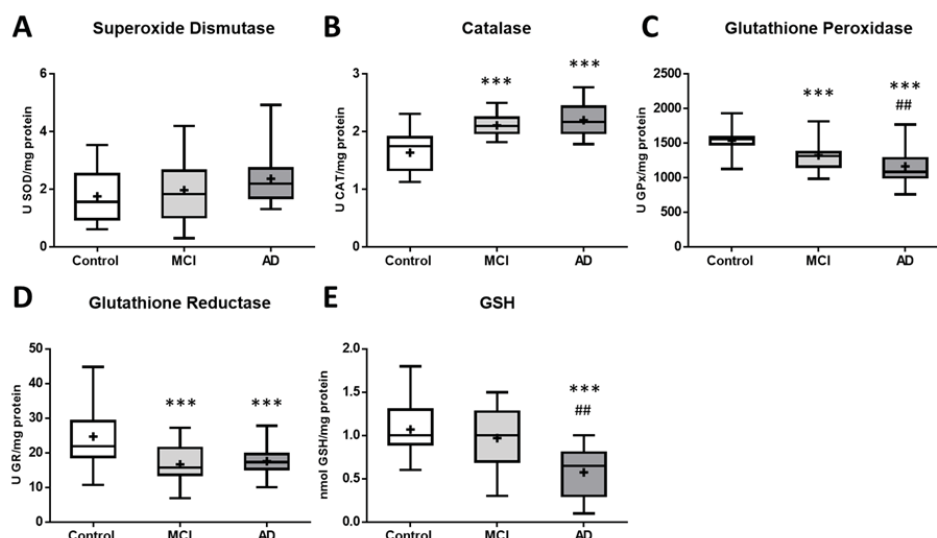


Figure 1. Antioxidant parameters in blood cells from Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) patients versus age-matched controls. A) Superoxide Dismutase activity; B) Catalase activity; C) Glutathione Peroxidase activity; D) Glutathione Reductase activity; E) Reduced glutathione concentration. The central rectangle spans the first to the third quartile (the interquartile range or IQR) and the horizontal bar depicts the median of data. Error bars depict the highest and lowest point within each data set. ***: $P < 0.001$ with respect to age-matched controls. ##: $P < 0.01$ with respect to MCI patients.

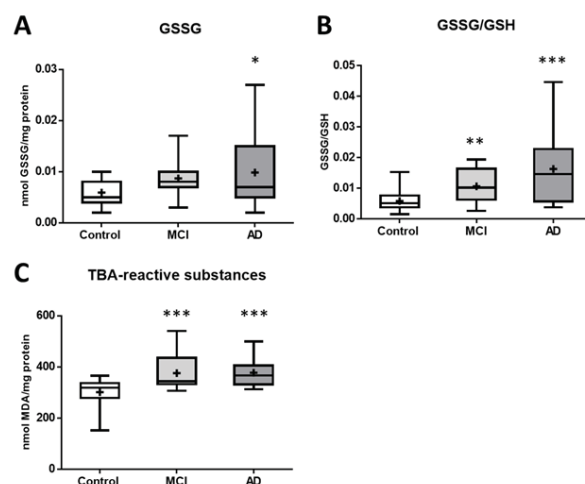


Figure 2. Oxidant parameters in blood cells from Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) patients versus age-matched controls. A) Oxidized glutathione (GSSG) concentration; B) GSSG/GSH ratio; C) TBA-reactive substances concentration. The central rectangle spans the first to the third quartile (the interquartile range or IQR) and the horizontal bar depicts the median of data. Error bars depict the highest and lowest point within each set of data. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ with respect to age-matched controls.

Previous data were analyzed including total population. Then, an additional analysis was performed subdividing groups by sex. With respect to sex-related differences in antioxidant parameters (Figure 3), control men showed higher SOD and GR activities ($P < 0.01$; $P < 0.05$) and lower CAT ($P < 0.05$) than control women. Within MCI and AD patients no significant differences in antioxidant parameters were found due to sex. Nevertheless, AD women showed higher SOD and CAT activities ($P < 0.01$; $P < 0.05$) and lower GPx, GR and GSH

concentration ($P < 0.05$) than age-matched control women. AD men showed higher CAT activity ($P < 0.001$) and lower GPx, GR and GSH ($P < 0.001$) than age-matched control men and also lower GPx ($P < 0.001$) and GSH ($P < 0.05$) than MCI men. With respect to individuals with mild cognitive impairment, MCI women showed lower GPx and GR activities ($P < 0.01$; $P < 0.05$; respectively) than control women, whereas MCI men showed higher CAT ($P < 0.001$) and lower GPx ($P < 0.05$) and GR activities ($P < 0.01$) than control men.

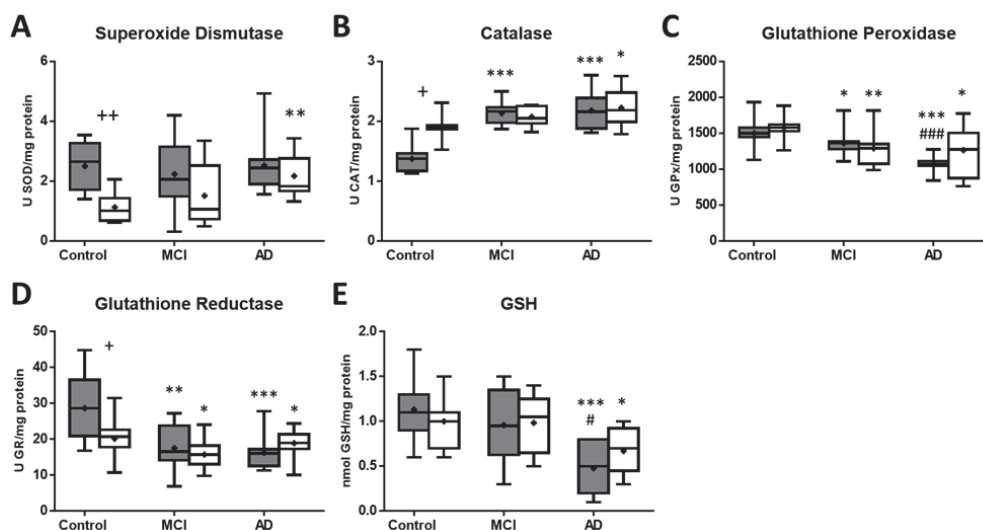


Figure 3. Antioxidant parameters in blood cells from men (grey boxes) and women (white boxes) with Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) versus age-matched controls. A) Superoxide Dismutase activity; B) Catalase activity; C) Glutathione Peroxidase activity; D) Glutathione Reductase activity; E) Reduced glutathione concentration. The central rectangle spans the first to the third quartile (the interquartile range or IQR) and the horizontal bar depicts the median of data. Error bars depict the highest and lowest point within each set of data. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ with respect to age and sex-matched controls. #: $P < 0.05$; ###: $P < 0.001$ with respect to sex-matched MCI patients. +: $P < 0.05$; ++: $P < 0.01$ between sexes within the same group.

With regard to oxidant parameters (Figure 4), no statistically significant differences were found within sexes, either in control, MCI and AD groups. However, both AD men and women displayed higher GSSG/GSH ratios ($P < 0.05$; $P < 0.01$; respectively) and higher TBARS ($P < 0.01$) than their controls. In addition, both MCI men and women showed higher TBARS ($P < 0.05$; $P < 0.01$; respectively) than their sex-matched controls.

In addition, the individual association of each redox parameter with cognitive decline was further investigated to order to identify which redox marker can be used to distinguish between

MCI and AD patients. For this purpose, the Pearson correlation coefficient was calculated for each redox marker and the MMSE scores obtained for MCI and AD groups together, including men and women. Regarding antioxidant parameters, a statistically significant positive correlation was found between GR activity and GSH concentration ($R=0.350$, $R=0.371$, $P < 0.05$) and MMSE score. With respect to oxidant parameters, a statistically significant negative correlation was found between GSSG concentration and GSSG/GSH ratio ($R=-0.373$, $R=-0.332$, $P < 0.05$) and MMSE score.

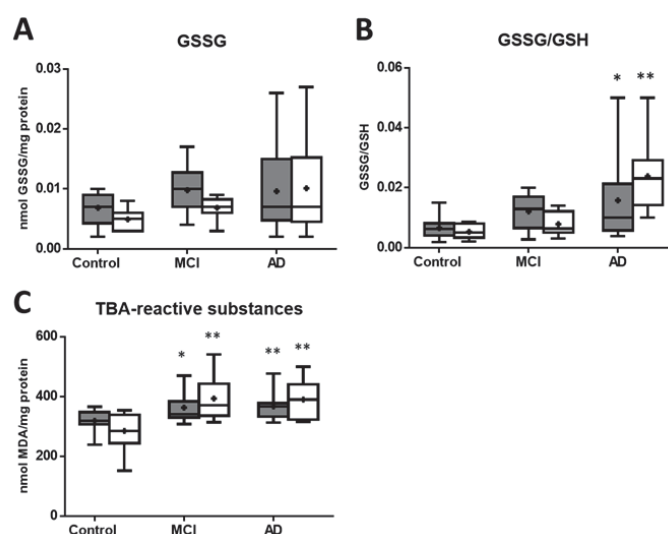


Figure 4. Oxidant parameters in blood cells from men (grey boxes) and women (white boxes) with Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD) versus age-matched controls. A) Oxidized glutathione (GSSG) concentration; B) GSSG/GSH ratio; C) TBA-reactive substances concentration. The central rectangle spans the first to the third quartile (the interquartile range or IQR) and the horizontal bar depicts the median of data. Error bars depict the highest and lowest point within each set of data. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ with respect to age and sex-matched controls.

Discussion

Research on Alzheimer's disease (AD) is moving forward at a very rapid pace. Clinical investigators are trying to move the diagnostic threshold for dementia and AD back to earlier stages of progression, while other scientists are correspondingly attempting to define biomarkers and genetic susceptibilities that will add specificity to the clinical diagnoses. As such, research in MCI will be likely to push back the threshold of recognition to an earlier state in the disease process to allow intervention at an earlier point than is currently done in typical AD clinical trials [30].

In AD, oxidative stress is one of the earliest events occurring prior to the onset of symptoms and it has been recognized as an essential contributor to the pathogenesis and progression of the disease [8, 31, 32]. Products of free radical damage, such as aldehydes or lipid

hydroperoxides, may diffuse into the blood where they can be detected. Moreover, it has been found that blood-brain barrier (BBB) permeability significantly increases in both AD and vascular dementia as compared to aging controls [33, 34]. Increased BBB permeability has been shown to trigger a chain of events leading to neuronal dysfunction and damage, as well as to specific clinical syndromes, including dementia [35]. In this context, oxidative stress has been shown to contribute to an increase in BBB permeability [36]. Consequently, oxidative stress parameters represent potential biomarkers in blood for diagnosis of AD. In addition, other diseases accompanied by free radical production, such as diabetes or cardiovascular diseases, may influence the presence of free radical products in the blood. This could explain the fact that the results of oxidative stress markers in AD, in several studies, have not been consistent using

blood samples [37]. Another limitation towards the establishment of oxidative stress markers for an early AD diagnosis relies on the use of different sample types of study, such as plasma, serum, mononuclear blood leukocytes, isolated erythrocytes or whole blood cells (containing leukocytes and erythrocytes). Thus, most of the studies have been focused on plasma and serum samples [38-46]. However, the redox status of plasma is highly influenced by diet, and most antioxidant enzymatic defense systems and compounds are intracellular. In a previous study from our group, it was demonstrated that the redox state of whole blood cells (erythrocytes and leukocytes) reflects that of isolated neutrophils, evidenced by higher GSSG/GSH ratio and MDA concentration in severe AD patients compared to mild AD patients and controls [17]. Therefore, in the present study whole blood cells were used given that this sample type is clinically more feasible, reproducible, cost effective, easy to implement and apply, compared to purified and isolated neutrophils and mononuclear blood leukocytes [17].

The results from the present study highlight the existence of an altered redox status in whole blood cells from AD patients and interestingly, some of the altered redox parameters are already affected in MCI patients. Given that the regulation of the redox balance in bloodstream is complex and in order to have a wide picture, several antioxidant and oxidant parameters were investigated in the present study. The results reveal that AD patients have higher CAT activity, GSSG and TBARS concentrations, and GSSG/GSH ratios, and lower GPx and GR activities, and GSH concentrations, compared to age-matched controls. In addition, MCI patients have a higher CAT activity and TBARS concentration, and lower GPx and GR activities than age-matched controls.

Regarding antioxidant enzyme activities, which constitute the first line of defense against generation of free radicals, we found striking differences. The significance of antioxidant changes upon conditions of oxidative stress is strongly under debate, since antioxidants might be induced by oxidative stress (and therefore their activity/levels may increase) or else be consumed (thus decreasing their activity and levels) [47]. Our results demonstrate that SOD activity was similar between MCI and AD patients and control individuals, which agrees with previous reported results [48-50], although higher SOD activity was found in AD women compared to age and sex-matched controls. Other studies have also found higher SOD activity in erythrocytes from AD patients by analysing total population, which consisted mainly of women

[51, 52]. With respect to CAT activity, both MCI and AD patients show higher catalase activity, which has also been found in other studies [52, 53]. This higher enzymatic activity could probably be a compensatory mechanism to counteract the increased H_2O_2 that has been reported in these patients. On the contrary, GPx activity was found to be lower in MCI and AD patients compared to control subjects, as has been previously reported [50]. Both CAT and GPx catalyse the conversion of H_2O_2 into water. The question is why does CAT activity increase, and GPx decrease in MCI and AD patients? From a kinetic point of view, GPx has a much higher affinity for H_2O_2 than CAT, therefore, H_2O_2 is principally degraded by GPx in normal conditions. However, when the H_2O_2 concentration increases, as in severe oxidative conditions, the CAT contribution for its degradation concomitantly increases [54]. In addition, CAT mediates conversion of H_2O_2 into water without requiring additional reducing equivalents and thus, no energy is required from the cell [55]. Therefore, this could be the reason why CAT activity is enhanced and GPx activity is diminished in both MCI and AD patients. Moreover, GPx also catalyzes the reduction of lipidic peroxides in addition to H_2O_2 , thus acting on more sensitive cellular targets. McCay et al. [56] showed that GPx protects biological membranes by preventing lipid peroxidation propagation. Thus, the impaired GPx activity found in blood cells from MCI and AD patients would exacerbate the accumulation of lipid peroxidation products. In fact, in the present study, it was found that MCI and AD patients have higher TBARS concentrations in whole blood cells compared to age and sex-matched controls. Given that lipid peroxidation is a damage marker of oxidative stress, it has been proposed as one of the most promising markers in AD diagnosis [57]. Some authors suggested that lipid peroxidation in the brain might be one of the factors responsible for cognitive deterioration, and a negative correlation between MDA concentration in plasma and severity of the AD stage has been reported [37, 53, 57, 58]. However, we found no association between TBARS concentration in blood cells and MMSE scores, which could be due to the lack of AD patients in more advanced stages of the disease. The glutathione cycle is one of the most important intracellular mechanisms that play a key role in the preservation of an adequate intracellular redox state [59]. In the present study, AD patients showed lower GR activities and GSH concentrations, together with higher GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios. Nevertheless, MCI patients only showed lower GR activity compared to age-matched controls.

Thus, these results suggest that this activity gets impaired in early stages of the disease whereas in more advanced stages of AD an accumulation of GSSG and an exhaustion of GSH occur. Interestingly, the parameters involved in the glutathione cycle (GR, GSH, GSSG, GSSG/GSH) were the most directly related to the degree of cognitive impairment, measured by MMSE, in accordance with other studies [60, 61].

With respect to AD prevalence, it is known that its incidence is higher in women than in men and this cannot simply be attributed to the higher longevity of women versus men, because it is also higher in young ages [62]. Thus, there must be a specific pathogenic mechanism to explain the higher incidence of AD cases in women. The results from the present study demonstrate that in the absence of pathology there are statistically significant differences in antioxidant activities due to sex, whereas in MCI and AD individuals these differences were not longer noticeable. It has been suggested that sex-related differences could be related to the role of sexual hormones. Estrogens are known to up-regulate the expression of SOD and GPx [62]. However, post-menopausal women experience a sharp fall in estrogens whereas men generally experience a more gradual age-related decline in testosterone [63]. This difference between how rapidly and significantly the female versus male primary sex hormones decline could explain in part why women are more vulnerable to oxidative stress in the elderly and why the incidence of AD is higher in women than in men.

Despite not having found sex-related differences between MCI and AD individuals, it was observed that whereas the alterations in antioxidant defense mechanisms were more significant in AD men than in AD women in comparison to their respective controls (such as higher CAT and lower GPx and GR activities and GSH concentration), the increase in oxidant compounds was more significant in AD women than in AD men (in GSSG/GSH ratios and TBARS concentrations) compared to their respective controls. Thus, these results suggest that the increased oxidative damaged products found in women, are not the result of an impaired antioxidant defense system but rather the consequence of the overproduction of reactive oxygen species, as has been previously suggested [64]. According to this, it has been reported that mitochondria from old female mice produce more ROS in the presence of A β peptide than those from old male mice [62].

In addition to age and sex, the presence of the ϵ 4 allele in apolipoprotein E (APOE) gene has been recognized as a major risk for sporadic AD [65–

67]. However, its relationship with oxidative stress is controversial. A few studies have found a relationship between the ϵ 4 allele APOE genotype and peripheral markers of oxidative damage, such as higher hydroxyl radical levels [68] and MDA [40] in plasma than those without this allele. However, others have found no differences [69], similar to that observed in the present study. The lack of statistically significant differences in our study could be due to the small number of patients with the ϵ 4 allele in APOE.

In conclusion, the major strength of our study is that we performed analysis in blood cells from patients with MCI and AD. With this kind of sample, we have demonstrated that some redox markers were affected in AD patients (lower GPx and GR activities and GSH concentrations and higher CAT activity and TBARS concentrations) with respect to control age-matched individuals. Interestingly, some of these markers were already altered in MCI patients from both sexes (such as GPx and GR activities and TBARS concentration) and therefore, could be used for early diagnosis of AD. In addition, other redox markers such as GR activity, GSH and GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios were found to be associated with cognitive decline. Even though these associations were modest due to the small sample size included in the present study, our data highlight the importance and the impact of peripheral redox state and homeostatic systems during the early cognitive decline leading to dementia. However, because oxidative stress and damage occur in several diseases (including other types of dementia), another group of demented subjects, distinct from AD, should be included in future studies. Still, given the easy obtainability of the sample type used and the simplicity of the assays performed, the combination of some redox whole blood cell markers, such as GPx and GR activities and TBARS concentration could be used to define their MCI stage. However, others like GR activity, GSH and GSSG concentrations and GSSG/GSH ratios have potential to be used in monitoring the progression of AD, once the pathology is established, in the clinical setting. Thus, we believe that the integration of several of the investigated parameters into a mathematical model could be used as a more reliable and consistent tool in the clinical setting. Nevertheless, a longitudinal design should be performed in order to elucidate the relationship between these markers and the course of the disease. Thus, although preliminary, these results could provide a benchmark for future work aimed at finding prognostic markers of Alzheimer disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants of FIS (PI15/01787) from the ISCIII-FEDER of the European Union and of UCM-Research Group.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to report.

References

1. Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies W, Phelps CH (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 257-62. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.004.
2. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* **9**, 63-75. doi: 10.1016/j.jalz.2012.11.007.
3. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* **34**, 939-44.
4. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 280-92. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.003.
5. Amieva H, Le Goff M, Millet X, Orgogozo JM, Pérès K, Barberger-Gateau P, Jacqmin-Gadda H, Dartigues JF (2008) Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms. *Ann neurol* **64**, 492-8. doi: 10.1002/ana.21509.
6. Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, Hansen LA, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Smith CD, Davis DG, Schmitt FA, Markesbery WR, Kaye J, Kurlan R, Hulette C, Kurland BF, Higdon R, Kukull W, Morris JC (2009) Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol aging* **30**, 1026-36. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.04.002.
7. Humpel C (2011) Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends biotechnol* **29**, 26-32. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.09.007.
8. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 759-67. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>.
9. Bonda DJ, Wang X, Perry G, Nunomura A, Tabaton M, Zhu X, Smith MA (2010) Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology* **59**, 290-294. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.04.005.
10. Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Hayashi Y, Nakayama K, Hayashi T (2007) Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron. *Biochemistry* **46**, 12737-12743. doi: 10.1021/bi701079z.
11. Hayashi T, Shishido N, Nakayama K, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Nakamura M (2007) Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide. *Free Radic Biol Med* **43**, 1552-1559. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.013.
12. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* **7**, 548-554. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02173-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02173-6).
13. Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **44**, 2051-7. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.012.
14. Matsumura A, Emoto MC, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Sato-Akaba H, Fujii HG, Shimohama S (2015) Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron

- paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med* **85**,165-73. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.013.
15. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR (2005) Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* **64**, 1152-6. doi: 10.1212/01.WNL.0000156156.13641.BA.
 16. Swomley AM, Butterfield DA (2015) Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics. *Arch toxicol* **89**, 1669-80. doi: 10.1007/s00204-015-1556-z.
 17. Vida C, Martínez de Toda I, Garrido A, Carro E, Molina JA, De la Fuente M (2018) Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Front Immunol* **8**, 1974. doi:10.3389/fimmu.2017.01974
 18. Peña-Bautista C, Vigor C, Galano JM, Oger C, Durand T, Ferrer I, Cuevas A, López-Cuevas R, Baquero M, López-Nogueroles M, Vento M, Hervás D, García-Blanco A, Cháfer-Pericás C (2018) Plasma lipid peroxidation biomarkers for early and non-invasive Alzheimer Disease detection. *Free Radic Biol Med* **124**, 388-394. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.038.
 19. Schrag M, Mueller C, Zabel M, Crofton A, Kirsch WM, Ghribi O, Squitti R, Perry G (2013) Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiol Dis* **59**, 100-10. doi: 10.1016/j.nbd.2013.07.005.
 20. Puertas MC, Martínez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ (2012) Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol* **47**, 625-30. doi: 10.1016/j.exger.2012.05.019.
 21. Lucas HR, Rifkind JM (2013) Considering the vascular hypothesis of Alzheimer's disease: effect of copper associated amyloid on red blood cells. *Adv Exp Med Biol* **765**, 131-138. doi: 10.1007/978-1-4614-4989-8_19.
 22. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263-269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
 23. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment; clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* **56**, 303-308.
 24. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) Mini-Mental State. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12**, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6).
 25. Martínez de Toda I, Vida C, Garrido A, De la Fuente M (2019) Redox parameters as markers of the rate of aging and predictors of lifespan. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. doi: 10.1093/gerona/glz033. [Epub ahead of print].
 26. Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* **195**, 133-140.
 27. Lawrence RA, Burck RF (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 952-8. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90747-6).
 28. Massey V, Williams CH (1965) On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem* **240**, 4470-4480.
 29. Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* **74**, 214-26. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
 30. Petersen RC (2009) Early diagnosis of Alzheimer's disease: is MCI too late? *Curr Alzheimer Res* **6**, 324-30. doi: 10.2174/156720509788929237.
 31. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2202-2210. doi: 10.1007/s00018-007-7218-4.
 32. Luca M, Luca A, Calandra C (2015) The Role of Oxidative Damage in the

- Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 504678. doi:10.1155/2015/504678.
33. Farrall AJ, Wardlaw JM (2009) Blood-brain barrier: ageing and microvascular diseases systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* **30**, 337–52. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.015.
 34. Popescu BO, Toescu EC, Popescu LM, Bajenaru O, Muresanu DF, Schultzberg M, Bogdanovic N (2009) Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *J Neurol Sci* **283**, 99–106. doi: 10.1016/j.jns.2009.02.321.
 35. Stanimirovic DB, Friedman A (2012) Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence?. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1207–1221. doi:10.1038/jcbfm.2012.25.
 36. Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N, Davis TP (2011) Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1625–36. doi: 10.1038/jcbfm.2010.29.
 37. Skoumalová A, Hort J (2012) Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **16**, 2291–300. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01585.x.
 38. Ozcankaya R, Delibas N (2002) Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J* **43**, 28–32.
 39. Polidori MC, Mecocci P (2002) Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* **4**, 517–22. doi: 10.3233/JAD-2002-4608.
 40. Aybek H, Ercan F, Aslan D, Sahiner T (2007) Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin Biochem* **40**, 172–6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.09.005
 41. Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksadel K, Leblhuber F, Fuchs D, Oetl K (2008) Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res* **42**, 633–8. doi: 10.1080/10715760802255764.
 42. Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R (2008) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res* **33**, 450–8. doi: 10.1007/s11064-007-9453-3
 43. Martín-Aragón S, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM (2009) Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **34**: 373–8. doi: 10.1007/s11064-008-9789-3.
 44. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P, Liguri G (2002) Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med* **15**, 1372–9. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01049-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01049-3).
 45. Sinem F, Dildar K, Gökhan E, Melda B, Orhan Y, Filiz M (2010) The serum protein and lipid oxidation marker levels in Alzheimer's disease and effects of cholinesterase inhibitors and antipsychotic drugs therapy. *Curr Alzheimer Res* **7**, 463–9. doi: 10.2174/156720510791383822.
 46. Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart É, Fulop T, Ramassamy C (2019) Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med* **130**, 499–511. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.452.
 47. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* **39**, 841–52. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.025.
 48. Gilca M, Lixandru D, Gaman L, Virgolici B, Atanasiu V, Stoian I (2014) Erythrocyte membrane stability to hydrogen peroxide is decreased in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **28**, 358–63. doi: 10.1097/WAD.0000000000000026.
 49. Jeandel C, Nicolas MB, Dubois F, Nabet-Belleville F, Penin F, Cuny G (1989) Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's

- disease. *Gerontology* **35**, 275-82. doi: 10.1159/000213037.
50. Sulkava R, Nordberg UR, Erkinjuntti T, Westermarck T (1986) Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase in Alzheimer's disease and other dementias. *Acta Neurol Scand* **73**, 487-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1986.tb04590.x>.
 51. Rossi L, Squitti R, Pasqualetti P, Marchese E, Cassetta E, Forastiere E, Rotilio G, Rossini PM, Finazzi-Agró A (2002) Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett* **329**, 137-40. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00599-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00599-2).
 52. Perrin R, Briançon S, Jeandel C, Artur Y, Minn A, Penin F, Siest G (1990) Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. *Gerontology* **36**, 306-13. doi: 10.1159/000213215.
 53. Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R, Marcourakis T (2011) Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **26**, 59-68. doi: 10.3233/JAD-2011-110284.
 54. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994) Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **17**, 235-48. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5).
 55. Day BJ (2009) Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol* **77**, 285-96. doi: 10.1016/j.bcp.2008.09.029.
 56. McCray PB, Gibson DD, Fong KL, Hornbrook KR (1976) Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **431**, 459-68. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(76\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(76)90212-5).
 57. Rani P, Krishnan S, Rani C (2017) Study on analysis of peripheral biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. *Front Neurol* **8**, 328. doi:10.3389/fneur.2017.00328.
 58. Marcourakis T, Camarini R, Kawamoto EK, Rodrigue-Scorsi L, Scavone C (2008) Peripheral biomarkers of oxidative stress in aging and Alzheimer's disease. *Dement Neuropsychol* **2**, 2-8. doi: 10.1590/S1980-57642009DN20100002
 59. Drögue W, Breitkreutz R (2000) Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* **59**, 595-600. <https://doi.org/10.1017/S0029665100000847>.
 60. Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM (2008) Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res* **42**, 162-170. doi: 10.1080/10715760701861373.
 61. Ponce PD, Felipe Salech F, San Martín C, Silva M, Xiong C, Roe CM, Henriquez M, Quest AF, Behrens MI (2014) Increased susceptibility to oxidative death of lymphocytes from Alzheimer patients correlates with dementia severity. *Curr Alzheimer Res* **11**, 892-898. doi: 10.2174/1567205011666141001113135.
 62. Viña J, Lloret A (2010) Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* **20**, S527-33. doi: 10.3233/JAD-2010-100501.
 63. Morley JE, Kaiser FE, Perry HM, Patrick P, Morley PM, Stauber PM, Vellas B, Baumgartner RN, Garry PJ (1997) Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism* **46**, 410-3. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90057-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90057-3).
 64. Schuessel K, Leutner S, Cairns NJ, Müller WE, Eckert A (2004) Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *J Neural Transm* **111**, 1167-82. doi: 10.1007/s00702-004-0156-5.
 65. Raygani AV, Zahrai M, Doosti M, Javadi E, Rezaei M, Pourmoyabbed T (2005) Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. *Neurosci Lett* **375**, 1-6.

- <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.073>.
66. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1977-1981.
 67. Tilley L, Morgan K, Kalsheker N (1998) Genetic risk factors in Alzheimer's disease. *J Clin Pathol* **51**, 293-304.
 68. Ihara Y, Hayabara T, Sasaki K, Kawada R, Nakashima Y, Kuroda S (2000) Relationship between oxidative stress and apoE phenotype in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* **102**, 346-349. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2000.102006346.x>.
 69. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P (2003) Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 915-919. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00031-9)

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Journal of Gerontology: Biological Sciences

Immune function, oxidative and inflammatory markers in centenarians as predictors of survival and indicators of recovery after hospital admission

Journal:	<i>Journal of Gerontology: Biological Sciences</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Martinez de Toda, Irene; FACULTY OF BIOLOGY, COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID, DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY (ANIMAL PHYSIOLOGY II); Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Vida, Carmen; FACULTY OF BIOLOGY. COMPLUTENSE UNIVERSITY, Department of Microbiology, Physiology and Genetics; Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, García-Salmones, Marta; Hospital Clínico San Carlos Alonso-Fernández, Patricia; Hospital Clínico San Carlos, Geriatric Department DE LA FUENTE, MONICA; FACULTY OF BIOLOGY, COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID, DEPARTMENT OF Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology)
Keywords:	Centenarian, Biomarkers, Immunity Function, Inflammation
Alternate Keyword:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

Immune function, oxidative and inflammatory markers in centenarians as predictors of survival and indicators of recovery after hospital admission

Irene Martínez de Toda, MSc^{1,2}, Carmen Vida, PhD^{1,2}, Marta García-Salmones, MD³,
Patricia Alonso-Fernández, MD³, Mónica De La Fuente, PhD, MD^{1,2}

¹Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

²Institute of Investigation Hospital 12 Octubre, Madrid, Spain

³Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

Corresponding Author: Mónica De la Fuente, PhD, MD, Department of Genetics, Physiology and Microbiology (Unit of Animal Physiology), Faculty of Biology, Complutense University, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mondelaf@bio.ucm.es

Abstract

Several parameters of immune function, oxidative and inflammatory stresses have been proposed as markers of health and predictors of longevity and mortality. However, it is unknown if any of these parameters can be predictive of survival in centenarians. Therefore, in a group of 27 centenarians, at the time of admission to the Clinical Hospital of Madrid, a series of immune function, antioxidant, oxidant and inflammatory parameters, were studied. Some centenarians survived and others did not, establishing two groups, "survivors" (n = 9) and "non-survivors" (n = 18). The results show that surviving centenarians display higher neutrophil chemotaxis and microbicidal capacity, NK activity, lymphoproliferation, glutathione reductase activity and basal IL-10 release. Moreover, they show lower neutrophil and lymphocyte adherence, superoxide anion and malondialdehyde concentrations and basal release of TNF- α . Therefore, these parameters have the potential to be used in the clinical setting as predictors of survival in centenarians. In the survivors group, the same parameters were also analyzed after three months. Since survivors showed an increase in neutrophil and lymphocyte chemotaxis capacity during the recovery period, reaching similar values to those observed in healthy centenarians, these could be proposed as indicators of recovery.

Keywords: longevity, odds ratio, survival prediction

INTRODUCTION

Centenarians are the best example of successful aging, given that they largely avoided the age-related diseases responsible for the high morbidity and mortality of aging and have reached the extreme limit of life in good clinical condition [1]. Thus, these individuals not only escape the typical infections of the elderly, but also show a peculiar resistance against most common age-related diseases through life, such as cancer, cardiovascular disease, dementia, diabetes and cataracts [2-4]. Consequently, in these individuals, morbidity is compressed toward the end of life (that is, health span approximates to life span) and then, there is a rapid onset of decline in the functional state which usually ends up in hospitalization and death. However, given that over the last decades there were not many centenarians, knowledge of

evidence-based health care in centenarians is still poor [5].

Nevertheless, given that the number of centenarians is projected to rise rapidly over the next few years [6,7], there is an urgent need to identify prognosis markers of outcome in this extreme long-lived group, due to the increasing evidence suggesting the different significance of health indicators in centenarians with respect to younger seniors [8, 9]. As such, traditional metabolic indices like glucose, triglycerides, cholesterol and creatinine levels have been found to be limited as prognostic markers in centenarians [8, 10]. Moreover, whereas high systolic blood pressure in adulthood is associated with an early mortality, in centenarians it has been found to be a strong predictor of survival for at least one year [8]. In the same study, higher survival probability was

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL PRIMER CAPÍTULO: Validación de una serie de parámetros de función y de estrés oxidativo en células inmunitarias como marcadores de edad biológica, mediante su estudio a distintas edades, en el proceso de envejecimiento, en ratones (longitudinal) y humanos (transversal), así como en un modelo de ratones adultos con envejecimiento prematuro.

Este objetivo se subdividió en los siguientes objetivos concretos:

4.1.1. ¿Algunos parámetros de función inmunitaria en leucocitos de sangre periférica en humanos y del peritoneo en ratones pueden ser usados como marcadores de edad biológica?

La respuesta se recoge en el [ARTÍCULO 1](#).

4.1.2. ¿Algunos parámetros de estrés oxidativo en células de sangre periférica en humanos y en leucocitos peritoneales de ratón pueden ser marcadores de la velocidad de envejecimiento?

La respuesta se recoge en el [ARTÍCULO 2](#).

Para dar respuesta al **primer sub-objetivo: ¿Algunos parámetros de función inmunitaria en leucocitos de sangre periférica en humanos y del peritoneo en ratones pueden ser usados como marcadores de edad biológica?**, se procedió a la determinación de la capacidad de migración de linfocitos y fagocitos, la capacidad de ingestión de partículas extrañas de fagocitos, la actividad citotóxica Natural Killer, así como la capacidad de respuesta proliferativa de linfocitos en células procedentes de sangre periférica en humanos y del peritoneo en ratones. Los análisis se realizaron a diferentes edades (adultos, maduros, mayores y longevos) de forma transversal en humanos, y en un estudio longitudinal, a las edades correspondientes, en ratones. Estas funciones también se valoraron en ratones adultos con envejecimiento prematuro.

Los resultados demuestran que, al avanzar la edad, tiene lugar un deterioro de la **capacidad de migración** de los leucocitos hacia el foco de infección, tanto en los linfocitos como en los fagocitos, resultados que concuerdan con trabajos previos realizados en humano y en ratón ([Simons y Reynolds, 1990](#); [Fulop et al. 2004](#); [De la Fuente, 2008b](#); [Arranz et al. 2010a](#)). Esta disminución de la quimiotaxis al envejecer podría deberse a las alteraciones que tienen lugar en la fluidez de la membrana y en las “balsas lipídicas” al avanzar la edad, como ha sido observado en neutrófilos ([Fulop et al. 2004](#)). Estas balsas lipídicas, constituyen pequeños dominios de la membrana plasmática especializados en la señalización intracelular, por lo que el mantenimiento de su integridad es esencial para una respuesta quimiotáctica eficiente ([Ibanez,](#)

2004). Sin embargo, los individuos longevos muestran una adecuada capacidad de migración en ambos tipos celulares, resultados que concuerdan con los previamente observados en ratones longevos e individuos centenarios (Alonso-Fernández, 2006; Alonso-Fernández et al. 2008; Borrás et al. 2016). A pesar de que en un principio se creía que los fagocitos jugaban un papel menos crucial en la disfunción inmunológica que se produce al avanzar la edad, investigaciones más recientes han apuntado al declive en estas células de varias funciones entre las que se incluyen la quimiotaxis y la **capacidad fagocítica**. Esta sería una de las razones del aumento de la susceptibilidad y vulnerabilidad a las infecciones bacterianas y víricas que presentan los ancianos, y que constituye la causa más frecuente de muerte en los individuos de edad avanzada (Ginaldi et al. 1999a; Lord et al. 2001; Fulop et al. 2004; De la Fuente et al. 2004b; 2005; 2008b). Así, de forma similar al deterioro observado en la capacidad de quimiotaxis en fagocitos, también se demostró que tiene lugar un deterioro de la capacidad fagocítica de los mismos al envejecer. Esta capacidad de ingerir partículas extrañas es fundamental tanto para la destrucción de microorganismos como para el correcto procesamiento de los mismos, que en última instancia permitirá a estas células llevar a cabo una apropiada presentación antigénica. Tal es su importancia que estudios previos han demostrado que una menor fagocitosis se asocia con una menor esperanza de vida tanto en ratón como en humano (Niwa et al. 1989; Guayerbas et al. 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003). De nuevo, los individuos longevos mostraron una adecuada capacidad fagocítica, confirmando lo observado en estudios previos (Alonso-Fernández et al. 2008; Arranz et al. 2010a).

Otro de los cambios que tiene lugar a lo largo del proceso de envejecimiento es la disminución de la **actividad citotóxica NK frente a células tumorales**, hecho que se ha descrito en trabajos previos, tanto en ratones como en humanos (Puerto et al. 2005; De la Rosa et al. 2006; De la Fuente, 2008b; Arranz et al. 2010a; Borrás et al. 2016). Este hecho es uno de los que parecen explicar el aumento en la incidencia de cánceres que sucede al envejecer. Los individuos longevos, por su parte, muestran una actividad citotóxica similar a la observada en adultos, lo que concuerda con observaciones previas de nuestro grupo de investigación (Puerto et al. 2005; Arranz et al. 2010a; Borrás et al. 2016), y que podría explicar la elevada resistencia que presentan los individuos longevos a padecer cáncer.

La **capacidad de respuesta proliferativa de los linfocitos** frente a mitógenos tales como la concanavalina A (Con A) o la fitohemaglutinina (PHA), que son estímulos para las células T, disminuye con la edad tanto en ratones como en humanos, respectivamente. Algunos autores han sugerido que este hecho se debe al declive asociado al proceso de envejecimiento del factor de crecimiento autocrino de las células T, la IL-2 (Guayerbas et al. 2002c; Pawelec et al. 2002a;

De la Fuente, 2008b). Por otro lado, se ha demostrado que los linfocitos T de personas de edades avanzadas tienen una menor expresión de receptores para IL-2 (Ginaldi et al. 1999b) además de un desgaste telomérico (Lord et al. 2002), hechos que también podrían explicar la disminución de esta respuesta inmunitaria al envejecer. Sin embargo, a pesar de que los individuos longevos mostraron una mayor proliferación en respuesta a Con A y PHA que los individuos viejos, ésta era inferior a la observada en adultos, y no sería suficiente como para explicar la gran resistencia que presentan estos individuos a contraer infecciones. Por tanto, se hipotetizó que estos sujetos podrían presentar una dinámica de proliferación distinta a la que resulta óptima en otras edades, hecho en el cual se profundizó en el segundo objetivo de la presente tesis.

Otra de las causas que han sido propuestas para explicar el deterioro funcional que sufren las células inmunitarias al envejecer es el aumento del estrés oxidativo que tiene lugar en éstas y todas las células del organismo al avanzar la edad (De La Fuente y Miquel, 2009; Vida et al. 2014). De este modo, si el mantenimiento de un adecuado balance entre compuestos oxidantes y antioxidantes es fundamental para el correcto funcionamiento de cualquier célula, este balance es más importante, si cabe, en las células inmunitarias, ya que éstas necesitan ser capaces de producir compuestos oxidantes, para llevar a cabo sus funciones defensivas como puede ser la destrucción de patógenos. Además, dado que la oxidación y la inflamación son procesos estrechamente ligados (Vida et al. 2014), el aumento del estrés oxidativo generará un aumento del estrés inflamatorio en estas células, produciéndose un bucle de retroalimentación positiva entre ambos y contribuyendo al deterioro funcional de estas células.

En base a esto, para dar respuesta al **segundo sub-objetivo: ¿Algunos parámetros de estrés oxidativo en sangre periférica de humanos y en leucocitos peritoneales de ratón pueden ser marcadores de la velocidad de envejecimiento?** nos centramos en el estudio de una serie de defensas antioxidantes (actividad catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), así como concentración de glutatión reducido (GSH)) y compuestos oxidantes (concentración de anión superóxido, glutatión oxidado (GSSG) y malondialdehído (MDA)) en sangre periférica de humanos y en leucocitos peritoneales de ratones. Las valoraciones se realizaron de manera transversal en hombres y mujeres a diferentes edades (adultos, maduros, mayores y longevos) y longitudinal en ratones a las correspondientes edades. Los mismos parámetros fueron también valorados en ratones adultos con envejecimiento prematuro.

Los resultados obtenidos demuestran que, al avanzar la edad, tiene lugar una disminución de las **actividades de las enzimas antioxidantes CAT y GPx**, tanto en células sanguíneas de humanos como en leucocitos peritoneales de ratón, lo cual coincide con lo

observado en otros estudios ([Guemouri et al. 1991](#); [Arranz et al. 2010a](#); [Vida et al. 2011](#)). Ambas enzimas están implicadas en la detoxificación del peróxido de hidrógeno, el cual constituye una de las especies reactivas del oxígeno que más incide en la oxidación celular dada su elevada vida media. Por tanto, la disminución asociada a la edad de ambas actividades podría contribuir al aumento de moléculas oxidadas que se observa al envejecer. Por el contrario, los individuos longevos tienen ambas actividades muy elevadas, siendo éstas incluso superiores a las detectadas en adultos, hecho que sugiere que estas enzimas podrían jugar un papel importante en el hecho de alcanzar una elevada longevidad. En consonancia con esta idea, se ha comprobado que aquellos ratones transgénicos que sobreexpresan catalasa presentan un envejecimiento más lento y tienen una mayor esperanza de vida media que animales no modificados que tienen una actividad normal de esta enzima ([Cutler, 2005](#); [Enns et al. 2008](#)).

Del mismo modo, en cuanto a la **actividad de la enzima GR** y en lo que respecta a la **concentración de GSH**, también se observó una disminución de ambas defensas antioxidantes al envejecer, al igual que ha sido descrito en otros estudios ([Hernanz et al. 2000](#); [Dröge, 2005](#); [Arranz et al. 2010a](#)). La actividad GR es sumamente importante ya que se encarga de mantener las reservas intracelulares de GSH en concentraciones óptimas. Este GSH es fundamental para el correcto funcionamiento de las células inmunitarias ya que se ha demostrado que una disminución del mismo, aunque sea moderada, inhibe tanto la proliferación de los linfocitos T como la actividad NK ([Dröge et al. 1994](#)). Sin embargo, los individuos longevos mostraron ambas defensas antioxidantes con valores similares a los observados en adultos, lo que explicaría la adecuada actividad proliferativa y citotóxica de sus células inmunitarias, como se comprobó en el primer sub-objetivo. De acuerdo con estos resultados, en otros estudios también se ha observado una mayor actividad GR en centenarios en comparación con sujetos de edades avanzadas ([Andersen et al. 1998](#); [Klapcinska et al. 2000](#)). En ratones longevos se ha comprobado que sus leucocitos peritoneales presentan una mayor concentración de GSH que la de estas células en animales viejos ([Arranz et al. 2010a](#)).

La disminución observada en las defensas antioxidantes en individuos viejos y muy viejos es coincidente con el aumento observado en compuestos oxidantes como sucede, al avanzar la edad, con la **concentración de GSSG** y, consecuentemente, con el **cociente GSSG/GSH**, lo que concuerda con lo obtenido en otros estudios ([Arranz et al. 2010a](#); [Vida et al. 2017](#)). Por otro lado, los individuos longevos muestran una concentración de GSSG y un cociente GSSG/GSH similar a los adultos, hecho que ha sido también puesto de manifiesto en otros trabajos ([Gil et al. 2006](#); [Arranz et al. 2010a](#); [Vida et al. 2017](#)). El cociente GSSG/GSH ha sido propuesto como un excelente indicador del estado de estrés oxidativo ([Zitka et al. 2012](#)) por lo que el hecho de

que los individuos longevos muestren un adecuado cociente manifestaría el correcto mantenimiento del balance redox de estos individuos.

De forma similar, los resultados de este sub-objetivo muestran un aumento asociado a la edad en las concentraciones de **anión superóxido y MDA**. Respecto a éste último parámetro, considerado como marcador de daño oxidativo a lípidos, los resultados observados son coincidentes con los obtenidos en otros estudios ([Naudi et al. 2013](#); [Vida et al. 2017](#)). El hecho de cuantificar un marcador de daño oxidativo tiene la ventaja de que es un indicador “per se” del balance entre compuestos oxidantes y antioxidantes. El MDA, además de ser un marcador de daño oxidativo, también se ha propuesto que interviene activamente en el envejecimiento a través de la propagación de la oxidación y el daño celular y tisular ([Pamplona et al. 2008](#)). Al igual que sucede con el resto de parámetros redox, los individuos longevos presentaron bajas concentraciones de ambos parámetros, lo que evidenciaría una mayor resistencia al estrés oxidativo de estos individuos, como ya ha sido sugerido en otros estudios ([Mecocci et al. 2000](#); [Barbieri et al. 2003](#); [Borras et al. 2016](#); [Jové et al. 2017](#)).

A pesar de que la mayoría de parámetros de estrés oxidativo investigados en humanos han sido determinados en la totalidad de las células sanguíneas (incluyendo tanto eritrocitos como leucocitos), mientras que los medidos en ratones fueron analizados en leucocitos peritoneales, se observó un patrón similar en cuanto a los cambios asociados a la edad. Además, se seleccionó como muestra de estudio las células totales de sangre ya que previamente se había demostrado que los parámetros de estrés oxidativo medidos en este tipo de muestra coincidían con los que presentaban los neutrófilos aislados ([Vida et al. 2018](#)). En el presente sub-objetivo se ha comprobado un hecho similar en lo referente a la concentración de MDA. Por ello, y dada la facilidad de obtención de ese tipo de muestra (células sanguíneas totales) en el ámbito clínico, en comparación con lo que supone el aislamiento de poblaciones leucocitarias, nos centramos en hacer las valoraciones en dicha muestra.

En conjunto, los resultados de este primer objetivo confirman que al avanzar la edad tiene lugar un deterioro de la función inmunitaria y un aumento del estrés oxidativo. Además, dado que en ratones el estudio se llevó a cabo de forma individualizada y longitudinal, se demuestra que estos cambios son debidos al proceso de envejecimiento “per se” y no a posibles diferencias entre grupos de distintas edades, que ha sido la forma de abordar este tema en la mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha.

A pesar de que son muchos los trabajos que han puesto de manifiesto el buen estado funcional y redox de las células inmunitarias de los individuos longevos, ningún estudio ha

constatado cómo se encuentran dichos parámetros cuando estos individuos longevos son adultos o viejos. Por tanto, el abordaje longitudinal del presente objetivo nos permite demostrar que los ratones que alcanzan una elevada longevidad, también experimentan un deterioro de la función inmunitaria y de las defensas antioxidantes y un aumento de los compuestos oxidantes en la vejez. No obstante, esos animales son capaces de poner en marcha mecanismos compensatorios, una vez superada la esperanza de vida media de la especie, mostrando valores óptimos en edades longevas. De hecho, en centenarios se identificó una “**firma redox**” típica de este grupo de edad, la cual se caracterizaba por la presencia de unas defensas antioxidantes muy elevadas y compuestos oxidantes bajos. Por tanto, estos resultados sugieren que la capacidad de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes en edades avanzadas es fundamental para alcanzar una gran longevidad. A pesar de que los mecanismos moleculares que podrían subyacer a dicha adaptación no han sido investigados en este objetivo, algunos mediadores como las citoquinas podrían jugar un papel primordial dada su capacidad de señalización y mediación funcional para muchas células. Este aspecto se tratará en el siguiente objetivo.

Por tanto, se demuestra que los parámetros estudiados de función inmunitaria y de estrés oxidativo tienen potencial para ser utilizados como marcadores de la velocidad de envejecimiento ya que experimentan cambios asociados a la edad (disminuyen o aumentan a medida que el individuo envejece) y aquellos individuos que logran alcanzar una elevada longevidad y que, por tanto, tienen un envejecimiento saludable, muestran dichos parámetros con valores de adultos sanos.

Sin embargo, para validar inequívocamente su papel como marcadores de edad biológica, era necesario verificar otro requisito: que aquellos individuos que presentaran en la edad adulta unos valores en esos marcadores similares a los que tienen los individuos viejos, tuviesen una menor longevidad. La validación se realizó analizando los mismos parámetros en un modelo natural de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM, del inglés, “*Prematurely Aging Mice*”). Así, se observó que estos PAM, a pesar de ser adultos, presentaban una capacidad proliferativa de linfocitos en respuesta a Con A, una actividad citotóxica Natural Killer, una capacidad de quimiotaxis, tanto en linfocitos como en macrófagos, así como una fagocitosis de macrófagos con valores similares a los observados en ratones cronológicamente viejos. Además, también se comprobó que tenían unas actividades CAT y GR, así como concentraciones de GSH, GSSG, anión superóxido y MDA más similares a las obtenidas en el grupo de ratones viejos que a las de ratones adultos no prematuramente envejecidos. Es posible que el mayor estrés oxidativo observado en los leucocitos peritoneales de los PAM explique su

peor capacidad funcional, como se ha sugerido previamente (De la Fuente y Miquel, 2009). También lo es que el deterioro de la función de estos leucocitos pueda causar un mayor estrés oxidativo, estableciéndose una espiral viciosa que conduciría a su envejecimiento prematuro.

La importancia de este modelo de envejecimiento prematuro en ratones radica en que es un modelo natural, el cual se basa en la selección de aquellos animales que presentan una inadecuada respuesta conductual ante una situación de estrés, como lo es el ser sometidos a la prueba del laberinto en T. Por tanto, además de las alteraciones que presentan en cuanto al sistema inmunitario, se ha demostrado que los PAM tienen también alterados el sistema nervioso y el endocrino, así como la comunicación neuroimmunoendocrina entre dichos sistemas (Viveros et al. 2001; Viveros et al. 2007; De la Fuente y Giménez-Llort, 2010; Vida et al. 2014; De La Fuente, 2018a). Sin embargo, se desconoce qué es lo que sucede primero en este contexto. Si bien son las alteraciones neuroquímicas a nivel de sistema nervioso, que serían responsables de la inadecuada respuesta a una situación estrés, las que se traducen en un deterioro de la función inmunitaria o si bien es la desregulación del sistema inmunitario la que ocurre primero y se traduciría en una mala respuesta al estrés. No obstante, independientemente del orden en el que sucedan los hechos, se ratifica que los parámetros de función y de estrés oxidativo del sistema inmunitario resultan ser válidos como marcadores de la velocidad de envejecimiento, ya que los ratones que en la edad adulta presentan dichos parámetros con valores similares a los obtenidos en ratones viejos tienen una menor longevidad que aquellos que tienen estos marcadores con valores propios de adultos.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL SEGUNDO OBJETIVO: Identificación de mecanismos celulares y moleculares implicados en la velocidad de envejecimiento y longevidad, mediante su estudio en ratones de distintas edades incluyendo aquellos que de forma natural alcanzan una elevada longevidad y ratones con envejecimiento prematuro.

Este objetivo fue subdividido en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

4.2.1. ¿La proliferación de linfocitos y la liberación de mediadores pro- y anti-inflamatorios pueden ser usados como marcadores de envejecimiento saludable y longevidad?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 3.

4.2.2. ¿La concentración basal de la proteína de choque térmico, Hsp70, puede servir como marcador de envejecimiento y longevidad?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 4.

Como se mencionó en la discusión del primer objetivo, un resultado que nos llamó la atención fue el hecho de que los individuos longevos (tanto ratones como humanos) presentaran una respuesta proliferativa, aunque ligeramente superior a la observada en los individuos viejos, inferior a la de adultos, mientras que tenían el resto de funciones inmunitarias más similares a la de sus correspondientes adultos. Dado que es un hecho conocido que los sujetos longevos tienen una alta resistencia a contraer infecciones, nos planteamos la hipótesis de que estos individuos podrían presentar una dinámica proliferativa distinta, como un mecanismo de adaptación a esa elevada longevidad, como previamente ya habían sugerido algunos autores ([Franceschi et al. 1995; 1996](#)). Por consiguiente, para dar respuesta al **primer sub-objetivo: ¿La proliferación de linfocitos y la liberación de mediadores pro- y anti-inflamatorios pueden ser usados como marcadores de envejecimiento saludable y longevidad?**, se procedió al estudio de la liberación de citoquinas y la capacidad proliferativa de linfocitos en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con Concanavalina A (Con A) tras 4, 24 y 48 horas de cultivo en ratones a distintas edades, incluyendo ratones longevos.

En cuanto a los resultados obtenidos en este **primer sub-objetivo**, se comprobó que la **respuesta proliferativa de los linfocitos frente al mitógeno Con A** durante 48 horas, disminuye al avanzar la edad, de acuerdo con lo observado en muchos otros estudios ([Solana et al. 1991; Hallgren et al. 1998; Hirokawa, 1998; Pawelec et al. 1999; 2002a; Arranz et al. 2010a; Salam et al. 2013](#)). No obstante, este es el primer trabajo en demostrar que tras 4 y 24 horas de estimulación, los linfocitos procedentes de ratones viejos también presentan una menor respuesta proliferativa que cuando eran adultos. Previamente se ha sugerido que el estrés oxidativo afecta a la capacidad de los linfocitos para responder a un estímulo mitogénico y antigénico ([Gougerot-Pocidallo et al. 1988; Pahlavani y Harris, 1998; Schieber y Chande, 2014](#)), por lo que el aumento del estrés oxidativo que tiene lugar al avanzar la edad en las células inmunitarias, como se ha observado en el primer objetivo de la presente tesis, podría ser una de las causas que explicaría la disminución en la respuesta proliferativa de los linfocitos al envejecer. Otra posible explicación podría ser que, dado que las células inmunitarias se dividen constantemente como resultado de la exposición frente a patógenos a lo largo de la vida, estas células podrían alcanzar una etapa de senescencia replicativa ([Effros y Pawelec, 1977; Fulop et al. 2013](#)), no siendo capaces de dividirse en la vejez.

Sin embargo, los ratones longevos presentaron una adecuada respuesta proliferativa de sus linfocitos, aunque con una dinámica diferencial. Así, en estos animales se observó una proliferación más elevada después de 4 y 24 horas de estimulación con Con A que la que mostraban cuando eran más jóvenes, mientras que tras 48 horas tenían una respuesta

proliferativa similar a la de viejos e inferior a la de adultos. De este modo, el elevado aumento de la proliferación de linfocitos a las 4 y 24 horas de estimulación en estos animales longevos indicaría una capacidad más rápida de respuesta frente a los antígenos, lo que podría representar una ventaja adaptativa en estas edades. Además, este aumento de la proliferación a las 4 horas en linfocitos de ratones viejos fue coincidente con el aumento en la liberación de IL-2 por dichas células, citoquina fundamental para la respuesta proliferativa de los linfocitos T (Boyman y Sprent, 2012). De este modo, la menor liberación de IL-2 tras 48 horas de cultivo encontrada en linfocitos de ratones viejos en comparación con la que presentaban cuando eran adultos justificaría la menor respuesta proliferativa observada a este tiempo. Por otro lado, el hecho de que el aumento de la proliferación tras 4 y 24 horas en linfocitos de ratones longevos no se observe después de 48 horas de incubación podría deberse a un aumento en la muerte celular inducida por activación (del inglés, “*Activation-Induced Cell Death: AICD*”). De hecho, este mecanismo desempeña un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario y es de suma importancia fisiológica, ya que la presencia de demasiadas células inmunitarias activadas puede desencadenar respuestas inmunitarias excesivas que conduzcan a trastornos autoinmunes y al shock tóxico (Russell, 1995; Kabelitz y Janssen, 1997; Marrack et al. 2010; Arakaki et al. 2014).

Es un hecho ampliamente conocido que las células inmunitarias se comunican entre sí a través de citoquinas, cuya estrecha regulación es clave para el adecuado funcionamiento de las mismas. Así, se ha descrito que al envejecer tanto la producción, como la liberación y la acción de estas citoquinas sufren alteraciones (Franceschi y Bonafe, 2003; De Martinis et al. 2006; Salvioli et al. 2006; De La Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al. 2010b). La mayoría de estos estudios se han centrado en el análisis de la liberación de citoquinas en poblaciones aisladas de células inmunitarias (Salvioli et al. 2006) y tras 48 horas de cultivo en presencia de una estimulación mitogénica (Arranz et al. 2010b). Por tanto, los resultados de este sub-objetivo son de especial relevancia, ya que se investigaron los cambios asociados a la edad en la liberación de citoquinas en cultivos con todos los leucocitos peritoneales, para reproducir con mayor precisión la respuesta que tiene lugar “in vivo”, y tras diferentes tiempos de incubación. Así, se observó que, **la liberación de citoquinas en respuesta a Con A** era menor en linfocitos de ratones viejos, tanto de pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, en comparación con cuando eran adultos, lo que resulta coincidente con resultados anteriores obtenidos en estudios transversales en ratones (Arranz et al. 2010b). La liberación de citoquinas es fundamental para la puesta en marcha de una adecuada respuesta inmunológica, por lo que la menor liberación de citoquinas observada en los leucocitos estimulados de ratones viejos podría ser una de las

causas del deterioro de las respuestas inmunitarias encontrada en individuos envejecidos (tanto en humanos como en ratones) (Wikby et al. 2005; De La Rosa, 2006; Simioni et al. 2007; De La Fuente y Miquel, 2009; Arranz et al. 2010b). Sin embargo, en los ratones longevos se observó una liberación de citoquinas similar a la que presentaban cuando eran adultos, resultados coincidentes con los obtenidos previamente en estudios transversales (Arranz et al. 2010b).

En el contexto de los cambios asociados a la edad en la proliferación de linfocitos, la mayoría de las investigaciones se han centrado en esta capacidad en respuesta a un estímulo, mientras que apenas hay trabajos que hayan investigado la proliferación de los linfocitos en ausencia de estimulación, esto es, en condiciones basales. No obstante, el estudio de la **linfoproliferación en condiciones basales** podría ser un marcador útil de la velocidad de envejecimiento, dado que proporciona información acerca del posible daño interno que está tratando de combatir el sistema inmunitario. En este contexto, se ha descrito que los patrones moleculares asociados al daño (del inglés, *“Damage-associated molecular patterns: DAMPs”*) aumentan al avanzar la edad como resultado de la mayor degeneración tisular y que son capaces de desencadenar una activación de la respuesta proliferativa a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Shaw et al. 2013). Los resultados del presente sub-objetivo mostraron que los linfocitos procedentes de ratones viejos tienen un aumento significativo de la proliferación basal con respecto a cuando eran más jóvenes, mientras que los linfocitos procedentes de ratones longevos manifiestan una proliferación basal similar a cuando eran adultos. Estos resultados sugieren que los leucocitos peritoneales de ratones viejos se encuentran activados en ausencia de estimulación, posiblemente debido a la mayor presencia de DAMPs, y que, a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, podrían ser responsables del establecimiento de la llamada “inflamación estéril” en la vejez (De La Fuente y Miquel, 2009; Shaw et al. 2013; Bauer y De La Fuente, 2016). Además, se ha sugerido que el estrés oxidativo puede activar *“per se”* vías de señalización que conducen a la proliferación y al aumento de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Oberley et al. 1981; Kim et al. 2001; Schieber y Chande, 2014). De acuerdo con esto, en este sub-objetivo se demostró que los linfocitos procedentes de ratones viejos tienen una mayor **liberación basal de citoquinas** pro-inflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en comparación con cuando eran adultos. Esta mayor liberación basal podría ser responsable del establecimiento de la inflamación crónica de bajo grado que se sabe tiene lugar en individuos de edades avanzadas (*“inflammaging”*). Por su parte, los linfocitos de ratones longevos mostraron una liberación basal aún mayor de IL-1 β e IL-6 en comparación con cuando eran viejos. Este hecho es sorprendente ya que elevadas cantidades de IL-1 β e IL-6 han sido consideradas predictores robustos de morbilidad y mortalidad en los

ancianos (Ferrucci et al. 1999; Harris et al. 1999). Es posible que esas elevadas concentraciones en individuos longevos fueran una consecuencia de la adaptación exitosa a distintos estreses, como las infecciones, que ocurren incesantemente a lo largo de la vida, como han propuesto otros autores (Franceschi et al. 2000a; Bauer y De La Fuente, 2016). A pesar de que la inflamación crónica de bajo grado es una característica común de las personas de edad avanzada y de los longevos, se ha sugerido que la diferencia entre ellos radica en que los longevos consiguen contrarrestar los efectos perjudiciales de esa “*inflammaging*” secretando elevadas cantidades de citoquinas anti-inflamatorias (Salvioli et al. 2013; Minciullo et al. 2016). De acuerdo con esta idea, se observó que los leucocitos de ratones longevos liberan altas concentraciones de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en condiciones basales, incluso más altas que cuando eran adultos, liberación que podría ser uno de los mecanismos subyacentes al mantenimiento de la salud en la longevidad, como se ha sugerido que sucede en ratas longevas (Dimitrijević et al. 2014). Además, la elevada liberación de IL-10 en leucocitos de ratones longevos tras 4 horas de cultivo podría explicar la disminución en los niveles de TNF- α que tiene lugar en estos animales tras las 24 y 48 horas de incubación, ya que IL-10 inhibe la liberación de TNF- α (Shin et al. 1999; Dagvadorj et al. 2008). Además, el presente sub-objetivo pone de manifiesto que la relación entre mediadores anti-inflamatorios y pro-inflamatorios (como el cociente IL-10/TNF- α) podría ser un parámetro útil para valorar la longevidad, dado que sus valores son similares en ratones adultos y longevos, mientras que los ratones viejos muestran un cociente disminuido. De hecho, un estudio reciente señaló el cociente entre compuestos anti-inflamatorios/pro-inflamatorios como un indicador del envejecimiento y la longevidad exitosa (Dimitrijević et al. 2014).

En conjunto, los resultados de este sub-objetivo sugieren que el estado pro-inflamatorio basal crónico mostrado por los leucocitos de animales viejos está vinculado a una respuesta inflamatoria defectuosa frente a un posible estímulo antigénico, lo que finalmente limitará la capacidad de estos animales para hacer frente a infecciones (Shaw et al. 2013). De hecho, se ha demostrado que aquellos octogenarios que producen bajas cantidades de citoquinas en respuesta a LPS, como la IL-6, el TNF- α y la IL-10, tienen el doble de probabilidades de morir en comparación con los individuos de la misma edad con una mayor producción de citoquinas en esas condiciones (Van Den Biggelaar et al. 2004). Por el contrario, los ratones extremadamente longevos, en general, mostraron un perfil de citoquinas en respuesta a Con A similar a cuando eran adultos, lo que demuestra que las células inmunitarias de individuos longevos tienen la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada. Estos resultados remarcen el hecho de que el estudio de una determinada respuesta inmunitaria,

como la linfoproliferación o la liberación de citoquinas, tras un tiempo fijo de incubación a lo largo del envejecimiento, puede llevar a la obtención de conclusiones erróneas, como ha sido sugerido por ciertos autores (Krabbe et al. 2004), debido a que los tiempos de respuesta óptimos pueden ser distintos a cada edad. Así, los resultados del presente sub-objetivo demuestran que lo que resulta adaptativo en ratones longevos es una respuesta proliferativa y de liberación de citoquinas más rápida y robusta, como la que se observa a las 4 horas de estimulación, que la que presentaban dichos animales en la edad adulta y en la vejez.

En conclusión, se deduce de este sub-objetivo que, si bien los efectos de la edad son sufridos por todos los individuos, aquellos con una mejor capacidad de control de la inflamación, por ejemplo, al potenciar la liberación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y restringir la de citoquinas inflamatorias como el TNF- α , serían los que conseguirían alcanzar una mayor longevidad. Además, el estudio sugiere que la relación IL-10/TNF- α en condiciones basales parece mejor indicador de la longevidad del ratón que cualquiera de los mediadores inflamatorios investigados por separado.

En cuanto al **segundo sub-objetivo: ¿La concentración basal de la proteína de choque térmico, Hsp70, puede ser usada como marcador de envejecimiento y longevidad?**, se procedió a estudiar los cambios asociados a la edad en la cantidad de la proteína Hsp70, ya que esta chaperona se sintetiza en situaciones en las que aumenta el número de proteínas mal plegadas en la célula. Dado que al envejecer aumenta el número de proteínas oxidadas y mal plegadas y se deteriora la capacidad del proteasoma para degradarlas, esta proteína podría jugar un papel decisivo en el mantenimiento de la homeostasis celular. Además, dado que la acumulación de proteínas dañadas no se produce a la misma velocidad en células mitóticas y post-mitóticas, debido a que las primeras son capaces de diluir sus orgánulos dañados en cada división celular mientras que las segundas no, nos propusimos investigar los niveles basales de Hsp70 en órganos mitóticos y post-mitóticos procedentes de ratones de distintas edades, incluyendo ratones longevos y ratones prematuramente envejecidos.

En primer lugar, se demostró que la concentración basal de Hsp70 experimentaba cambios con la edad en dos cepas distintas de ratones (ICR-CD1 y Balb/C). Además, se observó que estos cambios eran específicos del tejido investigado y que dependían de la composición celular principalmente post-mitótica o mitótica de los mismos, mostrando cambios con la edad en forma de U o en forma de U invertida, respectivamente. En concreto, en tejidos como el hígado o la médula renal, los cuales están compuestos principalmente por células mitóticas, se observó una mayor concentración de Hsp70 en ratones viejos en comparación con adultos. Estos

resultados contradicen un estudio previo realizado en hígado en el que se observó que los niveles de Hsp70 no se alteraban durante el envejecimiento en ratas. Sin embargo, el anticuerpo que se utilizó en dicho trabajo detectaba tanto la Hsp70 expresada constitutivamente (Hsc70) como la Hsp70 inducible por estrés (Hsp72) (Nardai et al. 2002). Por tanto, a pesar de que hubiese un aumento en las cantidades basales de Hsp70, éste podría haber sido enmascarado por una disminución en las de Hsc70. De hecho, otro estudio en ratas mostró una disminución relacionada con la edad en los niveles basales de Hsc70 en el hígado (Bonelli et al. 2008). En otro estudio llevado a cabo en hepatocitos primarios aislados de ratas jóvenes y senescentes, también se observó un aumento relacionado con la edad en la concentración basal de Hsp70 (Hall et al. 2001). Además, se detectó una acumulación de Hsp70 dependiente de la edad en fibroblastos envejecidos "in vitro" (Fonager et al. 2002). Por el contrario, en tejidos como el corazón, la corteza renal y la corteza cerebral, compuestos principalmente por células postmitóticas, se detectaron menores cantidades de Hsp70 en ratones viejos en comparación con los adultos. Esta disminución relacionada con la edad en los tejidos postmitóticos también fue apoyada por otros estudios realizados en corteza cerebral (Unno et al. 2000) y en corazón (Colotti et al. 2005) de ratas. En el bazo, el cual está compuesto principalmente por leucocitos, así como en leucocitos peritoneales, que en condiciones basales pueden considerarse como células postmitóticas, también se observaron niveles basales más bajos de Hsp70 en ratones viejos en comparación con los adultos. Resultados que coinciden con otros estudios realizados en monocitos (Njemini et al. 2002) y en neutrófilos humanos (Kovalenko et al. 2014), los cuales también mostraron una disminución relacionada con la edad en la concentración basal de Hsp70.

La chaperona Hsp70 es tan esencial para la vida y está tan bien conservada entre las especies que el gen que codifica para esta proteína (HSPA1A) ha sido denominado "vitagen" por Vittorio Calabrese y colaboradores (Calabrese et al. 2011; Calabrese et al. 2012; Cornelius et al. 2013). Además, la Hsp70 está involucrada, como un mecanismo de defensa, en procesos clave del envejecimiento celular como son la proteotoxicidad, la oxidación, la biogénesis mitocondrial, la apoptosis, la inmunosenescencia y la inflamación, convirtiéndose en un componente importante en la regulación del envejecimiento y la longevidad (Martínez de Toda y De la Fuente, 2015).

Así, en el contexto del sistema de control de la calidad proteica, el patrón diferencial observado en los cambios que con la edad experimentan las concentraciones de Hsp70 podrían explicarse por la diferente tasa de acumulación de daño que presentan las células mitóticas y post-mitóticas. En este sentido, los mayores niveles de Hsp70 encontrados en tejidos mitóticos

de ratones viejos, podrían ser el resultado de la adaptación al aumento en las modificaciones que experimentan de proteínas, como la oxidación y la glicación, entre otras y que se asocia a la edad (Calderwood et al. 2009). De este modo, el número creciente de proteínas mal plegadas liberaría el factor de transcripción HSF-1 e induciría la expresión de Hsp70. De acuerdo con la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento, el estrés oxidativo afecta principalmente a las células post-mitóticas y, por consiguiente, los tejidos postmitóticos son los que envejecen a una velocidad mayor ya que no son capaces de dividir sus componentes dañados por la oxidación, como las mitocondrias, durante cada división celular (De La Fuente y Miquel, 2009). En base a esto, uno esperaría que los tejidos postmitóticos fueran los que experimentaran el aumento más marcado en los niveles de Hsp70 al envejecer. Sin embargo, se encontraron menores cantidades de Hsp70 en estos tejidos de ratones viejos en comparación con los de adultos. Este hecho podría deberse a la incapacidad que presentan las células post-mitóticas de sujetos viejos para compensar el daño oxidativo al envejecer de manera que la capacidad de expresar la proteína Hsp70 de forma constitutiva se vería también afectada en estas células. De acuerdo con esto, en los leucocitos peritoneales de ratones viejos se observaron mayores concentraciones de MDA en comparación con las observadas en ratones adultos y longevos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que en las células postmitóticas se produce un agotamiento de la capacidad de síntesis de Hsp70 como consecuencia del estrés oxidativo que sufren estas células al avanzar la edad. De hecho, se ha descrito que tras una exposición crónica a compuestos oxidantes se inhibe la expresión de Hsp70 por regulación transcripcional mediada por ARN (Spiró et al. 2012). Aunque se necesitan más estudios para esclarecer los mecanismos subyacentes a este hecho, el desequilibrio redox asociado a la edad que tiene lugar en las células post-mitóticas podría inhibir la trimerización y consiguiente activación de HSF-1 (Ahn y Thiele, 2003) y, por tanto, la expresión de Hsp70.

Por otro lado, los cambios asociados a la edad en los niveles de Hsp70 pueden ser consecuencia del proceso de envejecimiento, pero también podrían estar involucrados en el mismo, dado el papel que la proteína Hsp70 tiene como inhibidor de la apoptosis (Rérole et al. 2011). Esta es una hipótesis interesante dado que la mayor síntesis basal de Hsp70 asociada a la edad que se observa en tejidos mitóticos contribuiría a que sus células no funcionales se volviesen resistentes a la apoptosis, lo que podría conducir a la división celular descontrolada y al cáncer. Por otro lado, la menor síntesis basal de Hsp70 relacionada con la edad que tiene lugar en los tejidos post-mitóticos haría que las células de los mismos fueran más vulnerables a la apoptosis, lo que provocaría la degeneración tisular.

La teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento vincula el estrés oxidativo e inflamatorio crónico con la velocidad a la que se envejece, y considera a la activación persistente del factor de transcripción NF- κ B en las células inmunitarias como un elemento relevante en el círculo vicioso de oxidación-inflamación que puede generarse al envejecer ([De la Fuente y Miquel, 2009](#)). Hsp70, como "vitaproteína" podría participar en este proceso, ya que se ha demostrado que puede actuar en muchos niveles de la vía de señalización del NF- κ B para inhibir o amortiguar su activación ([Guzhova et al. 1997](#); [Zheng et al. 2008](#)). De acuerdo con esto, la disminución de los niveles de Hsp70 en las células inmunitarias de los ratones viejos podría contribuir a la activación permanente de NF- κ B, y, por ende, a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias de forma crónica con la consiguiente aceleración del proceso de envejecimiento. Por su parte, en las células inmunitarias de los ratones longevos los niveles más altos de Hsp70 ayudarían a mantener el NF- κ B reprimido, como ha sido observado en estos animales previamente ([Arranz et al. 2010a](#)), lo que les permitiría el mantenimiento de mecanismos anti-inflamatorios eficientes, lo que se ha comprobado con los resultados obtenidos en el primer sub-objetivo.

Los cambios encontrados en los niveles de Hsp70 en ratones cronológicamente viejos también se observaron en ratones prematuramente envejecidos (PAM). De este modo, los PAM, a pesar de ser adultos, mostraron niveles de Hsp70 similares a los detectados en ratones viejos en médula renal, corteza cerebral, bazo y leucocitos peritoneales. Por otro lado, aquellos individuos que alcanzaron una elevada longevidad, mostraron niveles basales de Hsp70 más bajos en los tejidos mitóticos y más altos en los tejidos postmitóticos, similares a los observados en adultos. Una explicación plausible para estos resultados podría ser que, dado que los individuos longevos logran mantener un mejor espacio homeodinámico a lo largo de toda su vida, estos individuos han experimentado una menor acumulación de daño, lo que se refleja en una menor necesidad de Hsp70 en las células mitóticas y en una síntesis no deteriorada de Hsp70 en células postmitóticas. De hecho, de acuerdo con la idea de menor acumulación de daño, los leucocitos peritoneales de ratones longevos mostraron una concentración de MDA, el cual es un indicador de peroxidación lipídica, similar a la observada en adultos. Además, en tejidos postmitóticos, como el músculo y el cerebro, se ha demostrado que la Hsp70 promueve la biogénesis mitocondrial y regula los procesos de control de calidad mitocondrial de autofagia, fusión y fisión ([Gaweda-Walerych y Zekanowski, 2013](#); [Drew et al. 2014](#); [Henstridge et al. 2014](#)). Por lo indicado y dado que se ha demostrado que la sobreexpresión de Hsp70 está inversamente relacionada con el aumento asociado a la edad en marcadores de estrés oxidativo en el músculo ([Broome et al. 2006](#)), los mayores niveles de Hsp70 que muestran los ratones longevos en los

tejidos postmitóticos, en comparación con los ratones viejos, podrían garantizar el adecuado funcionamiento de las células, el control de la calidad de las mitocondrias y la disminución del daño por estrés oxidativo.

Ante el amplio espectro de funciones descritas para la Hsp70, se necesitan más estudios para dilucidar si su participación en el envejecimiento y la longevidad se basa en una función específica (mejorar la proteotoxicidad, contrarrestar el daño oxidativo, promover la biogénesis de las mitocondrias, inhibir la apoptosis o impedir el establecimiento del estrés inflamatorio), o si lo hace a través de una combinación de algunas o de todas ellas. Además, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la relevancia de la concentración basal de Hsp70 en el envejecimiento, y aunque dicha concentración basal es más modesta que la inducida en respuesta a un choque térmico u otros tipos de estrés, el impacto de este hecho podría ser más importante ya que son el resultado de una situación normal y frecuente, mientras que no lo es la capacidad de producir niveles muy altos de Hsp70 tras un choque térmico. Por ello, a pesar de que existen muchos marcadores potenciales que cambian con el envejecimiento, la demostración de que los ratones que envejecen prematuramente, los cuales tienen una menor longevidad, presenten una concentración basal de Hsp70 similar a los de los individuos cronológicamente viejos, mientras que los ratones longevos muestran una concentración basal de Hsp70 comparable a la de adultos, parece demostrar la relevancia de esta Hsp70 como un marcador de la velocidad de envejecimiento y longevidad saludable.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL TERCER OBJETIVO: Estudio de la relación existente entre una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales y de fragilidad, y la esperanza de vida alcanzada por cada ratón.

Este objetivo fue subdividido en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

4.3.1. ¿El poder predictivo de longevidad de una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio es el mismo a distintas edades?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 5.

4.3.2. ¿Qué parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales resultan más potentes en la edad adulta para predecir la longevidad en el ratón?

La respuesta se recoge en el ARTÍCULO 6.

4.3.3. ¿Los parámetros de fragilidad utilizados en humanos y aplicados a ratones pueden predecir la longevidad en estos animales?

La respuesta se recoge en el [ARTÍCULO 7](#).

Con el fin de dar respuesta a la pregunta planteada en el **primer sub-objetivo: ¿El poder predictivo de longevidad de una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio es el mismo a distintas edades?**, se procedió a estudiar la correlación existente entre los parámetros investigados, en la edad adulta, madura, vieja y muy vieja y la esperanza de vida alcanzada por cada ratón, de forma individualizada.

Los resultados obtenidos en este **primer sub-objetivo** mostraron que los parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio guardan una estrecha relación con la esperanza de vida alcanzada por cada ratón. Además, la contribución más importante es que esta relación con la esperanza de vida es diferente para algunos parámetros dependiendo de la edad del animal. Así, ciertos parámetros, como la capacidad proliferativa y migratoria de los linfocitos, la capacidad de migración e ingestión de partículas extrañas de macrófagos, la actividad antioxidante GPx, la concentración de GSH y MDA, y la liberación basal de IL-6, TNF- α e IL-10 correlacionan fuertemente con la esperanza de vida de cada ratón en la edad adulta. El hecho de que el estado de estos parámetros ya en la edad adulta guarde relación con la esperanza de vida alcanzada por cada ratón, demuestra la repercusión que tienen en la velocidad de envejecimiento del individuo y, por lo tanto, podrían usarse como biomarcadores de edad biológica. Pero, además, algunos de estos parámetros, como la quimiotaxis y fagocitosis de macrófagos, la actividad GPx y la liberación basal de TNF- α e IL-10 también correlacionaron fuertemente con la esperanza de vida de cada ratón en edades muy avanzadas, por lo que podrían ser marcadores que, determinados en animales viejos, sirvieran para discriminar a aquellos que podrán alcanzar una elevada longevidad de los que no.

El hecho de que la funcionalidad de los macrófagos se relacione con la esperanza de vida a lo largo del envejecimiento, apoya la relevancia de los fagocitos, células presentes en todos los animales, en la velocidad de envejecimiento de los individuos, como ya fue sugerido por nuestro grupo y posteriormente confirmado ([De La Fuente, 2004b](#); [De la Fuente, 2008a](#); [De La Fuente y Miquel, 2009](#); [Vida et al. 2017](#); [Vida et al. 2018](#)). De hecho, hemos propuesto a estas células como el principal tipo celular responsable del estrés oxidativo e inflamatorio crónico asociado con la inmunosenescencia, modulando, por tanto, la velocidad a la que cada individuo lleve a cabo su proceso de envejecimiento. Por otro lado, la fuerte correlación entre la actividad GPx y la esperanza de vida en edades tempranas y avanzadas, podría deberse a su capacidad

para neutralizar el peróxido de hidrógeno, lo que limitaría sus efectos nocivos, y de esta manera desempeñaría un papel fundamental contra el daño molecular asociado al establecimiento del estrés oxidativo. Pero, además, dado que la GPx también interviene en la inhibición de la degradación de la subunidad α inhibitoria del factor de transcripción NF- κ B (Li et al. 2000), mediante el bloqueo de la activación de NF- κ B, la GPx podría estar previniendo el establecimiento del estrés inflamatorio. De hecho, en un estudio previo se demostró que aquellos ratones que presentaban una baja activación del NF- κ B en los leucocitos peritoneales, en edades avanzadas, eran aquellos que lograban alcanzar una elevada longevidad (Arranz et al. 2010a). De acuerdo con esta idea, se encuentra también la observación de que cuanto menor es la liberación de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α y mayor la de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, a lo largo del envejecimiento, mayor es la esperanza de vida alcanzada por el animal.

Otro resultado sorprendente de este sub-objetivo es que, mientras que algunos parámetros no guardaban relación con la esperanza de vida en la edad adulta, en edades avanzadas se convierten en parámetros altamente discriminantes de longevidad. Este es el caso de la actividad citotóxica antitumoral NK, las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y GR, y la liberación basal de IL-6 e IL-1 β . Este hecho parece indicar que estos parámetros podrían reflejar algunos de los mecanismos de adaptación que subyacen al logro de una elevada longevidad. Con respecto a la actividad NK y las actividades CAT y GR, esta idea tendría un claro sentido biológico, puesto que cuanto mayor sea la actividad citotóxica contra células cancerígenas y cuanto mayor sea la disminución de ROS en edades avanzadas, mayor será la probabilidad de alcanzar edades longevas. Sin embargo, ¿cuál sería el “propósito biológico” de una mayor liberación basal de IL-6 e IL-1 β en edades muy avanzadas, si éstas podrían exacerbar el estrés inflamatorio crónico? Una posible explicación de este resultado, sería que los animales longevos tienen postergado el aumento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias característico de la vejez, siendo este el motivo por el que muestran elevados niveles en edades muy avanzadas. Otra posibilidad factible sería que estas citoquinas jugaran un papel esencial en edades avanzadas mediante la regulación y organización de otras células, ya que sólo aquellos ratones que muestran una liberación basal aumentada, son los que consiguen alcanzar una elevada longevidad. De acuerdo con esta idea, estudios recientes han demostrado que la liberación de IL-6 resulta esencial en la reprogramación celular en células senescentes (Chiche et al. 2017), por lo que la mayor liberación basal observada de IL-6 podría contribuir a revertir el silenciamiento asociado a la edad de genes antioxidantes y anti-inflamatorios importantes.

Otro hecho muy interesante que muestran los resultados de este sub-objetivo es que ciertos parámetros pueden indicar “pro-longevidad” o “anti-longevidad” dependiendo de la ventana de edad en la que sean determinados. Así, la actividad NK, CAT, GR y la liberación basal de IL-6 e IL-1 β en la edad adulta se asocian negativamente con la esperanza de vida, de manera que, cuanto mayores eran estos valores en la edad adulta, menor era la longevidad que alcanzaba el ratón. Sin embargo, el significado de los mismos cambia totalmente en edades avanzadas, de manera que, cuanto mayores son sus valores, mayor es la longevidad que tiene el animal. Por tanto, estos parámetros parecen exhibir un antagonismo pleiotrópico inverso. En este sentido, se han descrito más ejemplos de marcadores cuyos papeles (anti-longevidad temprana, pro-longevidad tardía) también cambian con el envejecimiento, como la presión arterial sistólica (Borghi et al. 2003; Paultre y Mosca, 2006; Blom et al. 2011; Poortvliet et al. 2013) o el índice de masa corporal (Auyeung y Lee, 2010; Flegal et al. 2013). Así, mientras que el tener una elevada presión arterial sistólica o un elevado índice de masa corporal en la edad adulta es predictivo de mortalidad, el tener esos mismos valores en edades avanzadas lo es de longevidad. Por lo tanto, estos resultados subrayan la necesidad de tener en cuenta la edad del individuo al investigar el poder predictivo de longevidad que tiene un parámetro determinado. Pero, además, estos resultados muestran aplicaciones prácticas importantes, ya que varias estrategias diseñadas para promover la longevidad pueden ser útiles, no tener efecto o incluso ser perjudiciales, dependiendo de la edad en la que se lleven a cabo, como ha sido sugerido previamente (Moeller et al. 2014). De acuerdo con esta idea, en un trabajo se demostró que la sobreexpresión de catalasa mitocondrial en ratones jóvenes resultaba ser perjudicial, mientras que su sobreexpresión en ratones viejos tenía un efecto positivo (Basisty et al. 2016). Esto sugiere que las ROS exhiben un antagonismo pleiotrópico convencional y explicaría por qué mecanismos antioxidantes más fuertes no han sido seleccionados evolutivamente en animales jóvenes en la naturaleza.

Nuestro estudio es también el primero en mostrar los cambios asociados al proceso de envejecimiento que experimenta un individuo longevo desde la edad adulta hasta la muerte, en parámetros de función, estrés oxidativo e inflamatorio en células inmunitarias. En este contexto, ha sido propuesto que los individuos longevos tienen una velocidad de envejecimiento más lenta o desacelerada (Franceschi et al. 2018), lo que les hace mantener un funcionamiento óptimo de sus células durante todo ese proceso. Sorprendentemente, los resultados del presente sub-objetivo revelan que los sujetos longevos no mantienen en sus células inmunitarias un funcionamiento y estado redox e inflamatorio óptimos a lo largo de su envejecimiento. De hecho, también experimentan un deterioro de todos esos parámetros de función y estado

redox-inflamatorio cuando son viejos (aunque en menor medida que el que sufren aquellos que no alcanzan edades tan elevadas). No obstante, los que llegan a longevos son capaces de generar mecanismos de adaptación y compensación, mostrando valores óptimos cuando alcanzan una gran longevidad. Por tanto, estos resultados sugieren que aquellos individuos que muestran una mayor plasticidad biológica u homeostasis adaptativa (Pomatto y Davies, 2017; Pomatto, 2019) en edades avanzadas, siendo capaces de restaurar e incluso aumentar la funcionalidad de macrófagos, la actividad NK, las actividades CAT, GPx, GR y la liberación basal de citoquinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10, alcanzan una gran longevidad. La limitación más importante de este estudio son los pocos ratones que alcanzaron una gran longevidad por lo que, estos resultados deben validarse en una muestra más grande de ratones. Además, la relación existente entre estos parámetros y la longevidad también debe investigarse en ratones macho, dadas las diferencias sexuales que hay no sólo en la esperanza de vida (mayor en las hembras), también en la inmunidad (más potente en hembras) y el estado oxidativo e inflamatorio (mayor en machos), entre otros aspectos (Fischinger et al. 2018). Por lo tanto, parece plausible que los marcadores que predicen la longevidad en ratones hembra puedan ser diferentes a los de los ratones macho. No obstante, los resultados del presente sub-objetivo ofrecen una nueva perspectiva sobre el uso de la función inmunitaria, los parámetros redox e inflamatorios como herramientas en la investigación del envejecimiento y representan un nuevo punto de referencia para trabajos futuros orientados a la predicción de la esperanza de vida en ratones. Además, dado que se ha demostrado en el primer objetivo de esta tesis que la funcionalidad y el estrés oxidativo de las células inmunitarias siguen un patrón similar en humanos y ratones, ciertas estrategias encaminadas a mejorar la funcionalidad de macrófagos, la actividad NK, las actividades antioxidantes enzimáticas, así como la liberación basal de citoquinas en personas de edades avanzadas, podrían ayudar a alcanzar una gran longevidad manteniendo un buen estado de salud.

En cuanto al **segundo sub-objetivo: ¿Qué parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio, así como conductuales resultan más potentes en la edad adulta para predecir la longevidad en el ratón?**, nos centramos en los marcadores que correlacionan con la esperanza de vida, según sus valores en la edad adulta, para la construcción de modelos matemáticos predictores de longevidad. Esto se sustentó principalmente en dos hechos, el primero, que es la edad en la que se puede disponer de mayor número de animales, lo cual nos permitirá desarrollar modelos matemáticos con mayor fuerza estadística, y el segundo es que cuanto antes seamos capaces de predecir una posible menor esperanza de vida, antes se podrán realizar estrategias que permitan, al ralentizar el proceso de envejecimiento, alargar la

longevidad. En este sub-objetivo, además de considerar los parámetros de función inmunitaria, de estrés oxidativo e inflamatorio se incluyeron también parámetros conductuales relacionados con la ansiedad y emotividad, debido a que se ha descrito que las respuestas inadecuadas al estrés causan una aceleración del envejecimiento (Perna et al. 2015; De La Fuente, 2018a).

En base a esto, se procedió a la construcción de distintos modelos matemáticos: un Modelo Inmunitario (basado en los parámetros de actividad NK, quimiotaxis de linfocitos y macrófagos, fagocitosis de macrófagos, capacidad linfoproliferativa y liberación basal de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10), un Modelo Redox (basado en la actividad CAT, GPx y GR, y las concentraciones de GSH, GSSG y MDA) y un Modelo Conductual (basado en los índices conductuales derivados de la prueba del tablero de agujeros y del laberinto en cruz elevado), así como un Modelo Combinado (incluyendo los parámetros seleccionados tanto en el Modelo Inmunitario como en el Redox), mediante regresión lineal múltiple. Además, los modelos se validaron en diferentes grupos de ratones. Este enfoque nos permitió, en primer lugar, comprobar qué parámetros están más relacionados con la longevidad; en segundo lugar, evaluar qué cohorte de parámetros (si los parámetros de función inmunitaria, redox o conductuales) es más relevante para la predicción de la esperanza de vida, y, en tercer lugar, qué modelo tiene una mayor capacidad de extrapolación al verificar su poder predictivo en grupos de animales diferentes a los usados para la generación de los modelos.

Para la construcción de los modelos, se siguió el método de “paso adelante” (del inglés, “*step forward*”), el cual selecciona en primer lugar, la variable que guarda mayor relación con la esperanza de vida, a continuación, la siguiente, y así consecutivamente, siempre y cuando la variable cumpla el requisito de ser significativa ($P < 0.05$) una vez integrada en el modelo.

En el **Modelo Inmunitario**, las dos variables más importantes seleccionadas fueron la quimiotaxis y la fagocitosis de macrófagos. El hecho de que ambas funciones de los macrófagos expliquen casi el 70% de la varianza en la esperanza de vida, apoya la hipótesis de que los fagocitos, como se ha comentado antes, puedan representar el tipo celular más implicado en la velocidad de envejecimiento de un sujeto (De la Fuente, 2008a; De la Fuente y Miquel, 2009; Vida et al. 2017; Vida et al. 2018). La selección de una tercera variable, la capacidad proliferativa de los linfocitos, hizo que el modelo explicara casi el 76% de las diferencias en la esperanza de vida. La importancia de la capacidad proliferativa de los linfocitos en la esperanza de vida concuerda con estudios previos en los que este marcador se ha utilizado para determinar el perfil de riesgo inmunitario en humanos, el cual es predictivo de mortalidad (DeLaRosa et al. 2006).

Con respecto al **Modelo Redox**, se encontró que las concentraciones de GSH, MDA y la actividad GPx explican casi el 85% de la varianza en la esperanza de vida alcanzada. Se sabe que las células inmunitarias se encuentran entre los tipos celulares en los que un equilibrio redox óptimo es más crítico para su buen funcionamiento, dado que necesitan producir constantemente compuestos oxidantes y pro-inflamatorios para ejercer su función defensiva contra agentes patógenos y cancerígenos (De La Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2018a; 2018b). Por tanto, es comprensible pensar que cuanto mayor sea la concentración de GSH y la actividad antioxidante GPx, y menor sea la de MDA en las células inmunitarias, mejor será el equilibrio redox de estas células y, por lo tanto, su función. De hecho, se ha demostrado que el GSH es esencial para el funcionamiento adecuado de las células inmunitarias, dado que incluso un agotamiento moderado de GSH afecta a varias funciones de los leucocitos (Dröge y Breitkreutz, 2000). Se ha demostrado también que el MDA, el cual es un producto final de la peroxidación lipídica inducida por ROS y, por lo tanto, es utilizado como marcador de estrés oxidativo, desempeña un papel activo al inducir los enlaces cruzados en las proteínas y formar productos finales de glicosilación avanzada (del inglés, “*Advanced Glycated End Products*”: AGEs) irreversibles (Esterbauer et al. 1990). Estos AGEs aumentan la expresión del receptor anclado a la membrana para los AGE y activan el factor nuclear kappa B (NF-κB) que induce la producción de una gran variedad de citoquinas pro-inflamatorias (Cai et al. 2018). Por otro lado, se sabe que la actividad GPx además de contrarrestar el establecimiento del estrés oxidativo, mediante la neutralización del H₂O₂, también lo hace del establecimiento del estrés inflamatorio, mediante la inhibición de la degradación del inhibidor del NF-κB (Li et al. 2000).

En el **Modelo Conductual**, las dos variables que de manera conjunta explicaban el 80% de la varianza en la esperanza de vida, fueron la locomoción en la zona interna del tablero de agujeros y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado. Dado que los ratones tienen una aversión natural al centro iluminado de un campo abierto, la exploración del espacio interior en la prueba del tablero de agujeros, así como la exploración de los brazos abiertos en la prueba del laberinto en cruz elevado, son indicadores de un comportamiento no ansioso (Crawley, 2000; Kassed y Herkenham, 2004). Esto lleva a la conclusión de que cuanto menor sea el comportamiento de ansiedad que un ratón muestra en la edad adulta, más tiempo va a vivir. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en el que se utilizaron índices de comportamiento en ratones macho viejos para la predicción de longevidad y las variables que correlacionaron más positivamente con la esperanza de vida restante fueron la distancia recorrida en campo abierto y el número de entradas en brazos abiertos del laberinto en cruz elevado (Fahlström et al. 2012).

El siguiente paso fue desarrollar otro modelo, el cual considerase más de una dimensión para la predicción de la esperanza de vida. Para ello, decidimos centrarnos en las variables seleccionadas en el Modelo Inmunitario y Modelo Redox. Estas variables se priorizaron sobre las conductuales con la finalidad de desarrollar un modelo que pudiese ser fácilmente extrapolable a humanos. De acuerdo con esto, se ha demostrado en el primer objetivo de la presente tesis, que los cambios con la edad en los parámetros de función y estado redox, que fueron estudiados, siguen un patrón similar en humanos y ratones. En lo referente a la conducta, a pesar del hecho de que los rasgos de ansiedad también se han relacionado con un envejecimiento acelerado en los seres humanos ([Perna et al. 2015](#)), las pruebas de comportamiento realizadas en el presente estudio en ratones no se pueden realizar de forma equivalente en los seres humanos. De este modo, se obtuvo el **Modelo Combinado** que incluye las variables fagocitosis de macrófagos y quimiotaxis, capacidad de linfoproliferación, GSH, MDA y GPx, el cual explica casi el 90% de la varianza total en la esperanza de vida.

A pesar de que el valor potencial de los modelos construidos que predicen la longevidad es considerable y que los esfuerzos dirigidos a formular dichos modelos sirven para identificar los factores que regulan la longevidad, el paso más importante es la validación de los mismos. Con ella podremos saber qué capacidad de aplicación tiene un determinado modelo y conocer su utilidad en contextos prácticos ([Duda et al. 2001](#)). Para poder hacerlo se requiere aplicar cada modelo a un nuevo conjunto de animales que no han sido utilizados para la previa construcción del mismo. Por ello, se llevó a cabo la verificación de la reproducibilidad de cada uno de los cuatro modelos construidos (Modelo Inmunitario, Redox, Conductual y Combinado) utilizando un conjunto diferente de ratones. Así, se demostró que mientras que los cuatro modelos son útiles para la predicción de la esperanza de vida en un conjunto diferente de ratones, los más robustos son el Modelo Inmunitario y el Modelo Combinado. Es importante destacar que los ratones utilizados para el presente estudio son “*outbred*” lo que significa que proceden de progenitores sin relación consanguínea, lo que implica que presentan una mayor heterogeneidad entre sí. Por tanto, la reproducibilidad del modelo cobra, si cabe, mayor relevancia que si se hubiese realizado utilizando otras cepas de ratones “*inbred*”, las cuales son consanguíneas y mucho más homogéneas, como la comúnmente utilizada cepa C57/BL6. Por lo tanto, y aunque los modelos propuestos deben investigarse en muestras más grandes, también en machos y en otras cepas de ratones, los resultados de este sub-objetivo resaltan la importancia, para tener una elevada longevidad en ratones, de disponer de respuestas conductuales correctas frente a situaciones de estrés, de tener apropiadas capacidades de quimiotaxis y de fagocitosis en macrófagos, y proliferación en linfocitos, así como unas

adecuadas concentraciones de GSH y MDA y actividad enzimática GPx en las células inmunitarias.

En cuanto al **tercer sub-objetivo: ¿Los parámetros de fragilidad utilizados en humanos y aplicados a ratones pueden predecir la longevidad en estos animales?**, nos centramos en los criterios de fragilidad propuestos en el Test Valencia. Este test adapta los criterios de fragilidad que se tienen fundamentalmente en cuenta en humanos ([Fried et al. 2001](#)) a ratones mediante la determinación de 5 variables: pérdida de peso superior al 5 % en el último mes, tiempo corriendo y velocidad máxima alcanzada en la cinta rodante, fuerza de agarre y coordinación motora ([Gómez-Cabrera et al. 2017](#)). Estas variables fueron analizadas en ratones adultos, maduros y viejos (N=10, respectivamente) para establecer los valores de referencia para cada edad. Los índices se determinaron calculando el percentil 20 en el caso del tiempo y velocidad alcanzada en la cinta rodante, así como en la fuerza de agarre, considerando frágiles para una variable determinada a aquellos ratones que presentaron un valor inferior al percentil 20 de su grupo de edad para dicha variable. En cuanto a la variable pérdida de peso, los ratones se considerarían frágiles si perdieron más del 5% del peso en el último mes. Respecto a la coordinación motora, los animales serían frágiles si no eran capaces de completar la prueba de la tabla de madera (del inglés, “*wood-rod test*”) en ninguno de los 5 intentos. De tal manera que, si un ratón no resulta ser frágil para ninguna de las cinco variables contempladas, se considera robusto; si es frágil para una o dos de las cinco variables, se considera pre-frágil y si es frágil para tres o más de las cinco variables es considerado frágil. Así, con estas premisas, en un nuevo lote de ratones se calculó un índice de fragilidad individual para cada ratón en la edad adulta, madura y vieja a través de un estudio longitudinal y se investigó la relación existente entre el índice de fragilidad y la esperanza de vida. También se calculó un índice de fragilidad individual en ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y ratones excepcionales no prematuramente envejecidos (E-NPAM). El estudio longitudinal se realizó usando ratones normales no prematuramente envejecidos (*regular non prematurely aging mice*: R-NPAM), los cuales muestran respuestas conductuales intermedias ante la prueba del laberinto en T y representan entre el 70 y el 80% de la población.

Los resultados de este sub-objetivo demuestran que los criterios contemplados en el “Test Valencia” son válidos para cuantificar la fragilidad en ratones ICR-CD1 hembras, ya que a medida que los animales envejecieron, mostraron peores resultados en las pruebas que determinaron los componentes de fragilidad: fuerza de agarre neta, resistencia, lentitud y coordinación motora, verificando que los criterios seleccionados son una buena opción para el establecimiento de un índice de fragilidad. Además, este es el primer estudio realizado en

ratones en el que se ha investigado la fragilidad en la edad adulta, así como en un modelo de ratones con envejecimiento prematuro, para conocer mejor la compleja relación entre el envejecimiento y la fragilidad. Los resultados muestran que el grupo de PAM, a pesar de ser adultos, muestra una puntuación de fragilidad similar a la obtenida en ratones cronológicamente maduros, mientras que el grupo de E-NPAM de la misma edad muestra una puntuación de fragilidad de 0, incluso más baja que la obtenida en los R-NPAM. Por lo tanto, estos resultados demuestran que los PAM también son prematuramente frágiles. Además, el grupo de PAM exhibió una menor longevidad que el grupo de R-NPAM y E-NPAM, mientras que los E-NPAM tuvieron una mayor esperanza de vida que el grupo de R-NPAM. De los resultados se deduce que existe una relación entre el índice de fragilidad de un grupo de ratones y su esperanza de vida.

Este es el primer estudio en el que se han calculado índices de fragilidad individuales en ratones a diferentes edades para detectar diferencias entre individuos y arrojar luz sobre la naturaleza heterogénea y acumulativa de la fragilidad. Es importante destacar el hecho de que en el grupo de R-NPAM ya en la edad adulta, el 10% de los ratones era frágil y el 20% eran pre-frágiles. Esto demuestra que la fragilidad, no puede y no debe medirse sólo en la vejez, dado que, entendida como la acumulación de déficits, se produce a diferente velocidad en individuos de la misma edad cronológica (Liu et al. 2014). Además, esta heterogeneidad también fue observada en el grupo de PAM. Así, a pesar de que el 40% eran frágiles y el 40% eran pre-frágiles, el 20% de ellos eran robustos. En contraste, todos los ratones clasificados como E-NPAM eran robustos. Otro hecho a destacar es que la prevalencia de fragilidad en la edad madura y en la vejez fue de 12% y 11% respectivamente, lo que es coincidente con la prevalencia de la fragilidad observada en personas de edad avanzada cuando se aplica la escala de fragilidad propuesta por Fried y colaboradores (Fried et al. 2001).

Del mismo modo, y dado que la escala de fragilidad de Fried ha sido validada como predictor de mortalidad en humanos, también se investigó la relación entre el índice de fragilidad individual de un ratón determinado, y su respectiva esperanza de vida. Los resultados de este estudio demuestran que el Test Valencia desarrollado para ratones puede ser usado como predictivo de longevidad dada la alta correlación obtenida entre el índice de fragilidad individual de un ratón (independientemente del punto de edad en que se estableció) y su respectiva esperanza de vida. Así, aquellos R-NPAM adultos que se consideraban frágiles y pre-frágiles a esta edad mostraron una menor longevidad que los robustos. A su vez, aquellos que se consideraban frágiles tenían una menor longevidad que los pre-frágiles. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque la edad biológica y la fragilidad están estrechamente

relacionadas, no necesariamente se superponen. De hecho, dentro del grupo de PAM, aunque mostraron una menor longevidad que sus homólogos E-NPAM, se encontraron diferencias respecto a su estado de fragilidad individual. Por lo tanto, se observaron PAM frágiles, PAM pre-frágiles y PAM robustos, y estos diferentes índices de fragilidad guardaban relación con la longevidad alcanzada por los mismos. Cabe destacar el hecho de que la edad biológica parece tener un papel dominante sobre el índice de fragilidad, ya que los PAM robustos presentaron una menor longevidad que los R-NPAM robustos. Por lo tanto, el índice de fragilidad podría ser una herramienta útil que proporcionase información adicional para definir o clasificar mejor a los individuos con envejecimiento prematuro. También, los resultados demuestran la utilidad del índice de fragilidad individual calculado en las edades madura y vieja para predecir la longevidad.

En resumen, los resultados de este sub-objetivo demuestran que el índice de fragilidad, tanto individual como de grupo, cuantificado mediante el "Test Valencia" es un factor predictivo de esperanza de vida a la edad adulta, madura y vieja. La demostración de que la fragilidad pueda ser cuantificada en la edad adulta, abre la posibilidad de realizar intervenciones a largo plazo, tanto nutricionales como de actividad física, entre otras, a partir de esa edad adulta para revertir dicho estado. Además, dado que el "Test Valencia" contempla criterios simples y no invasivos, puede ser aplicado para la cuantificación de la fragilidad en modelos experimentales de forma longitudinal en cualquier laboratorio. Y lo más importante, dado que proporciona una definición estandarizada para la fragilidad en ratones que es consistente con la definición operativa de fragilidad en hombres y mujeres, los resultados tienen potencial para ser extrapolables a humanos.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES AL CUARTO OBJETIVO: Validación de parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio como marcadores, en humanos, de envejecimiento acelerado, patológico y como predictores de supervivencia en centenarios tras un ingreso hospitalario e indicadores de su recuperación.

Este objetivo fue subdividido en los siguientes sub-objetivos que se enuncian como preguntas:

4.4.1. ¿Los parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio se ven alterados en mujeres que presentan un alto grado de estrés percibido?

La respuesta se recoge en el [ARTÍCULO 8](#).

4.4.2. ¿Los parámetros de estrés oxidativo en células de sangre periférica pueden ser utilizados como marcadores prodrómicos de la enfermedad de Alzheimer?

La respuesta se recoge en el [ARTÍCULO 9](#).

4.4.3. ¿Qué parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio pueden ser predictivos de supervivencia tras un ingreso hospitalario en individuos centenarios, e indicadores de recuperación?

La respuesta se recoge en el [ARTÍCULO 10](#).

En relación al primer sub-objetivo, son muchos los trabajos que han relacionado el tener una mala respuesta al estrés con un envejecimiento acelerado ([Perna et al. 2005](#); [De La Fuente, 2018a](#)). En este contexto, varios estudios han demostrado que aquellos individuos que son sometidos a un estrés crónico, muestran un deterioro de la función inmunitaria. No obstante, apenas hay estudios de este tipo en los que hayan tenido en cuenta cómo el individuo percibe dicho estrés ([Goldman et al. 2005](#)). En cambio, la noción de que nuestra interpretación particular de los eventos es crucial para la respuesta fisiológica que se va a desencadenar, se conoce desde hace muchos años. De hecho, [Cohen y colaboradores \(1997\)](#) describieron un modelo en el que subdividían la respuesta al estrés en varias etapas. La primera de las cuales consistía en la evaluación de la naturaleza amenazadora de los factores estresantes, en la que circunstancias tales como la personalidad individual, las experiencias personales, los recursos, los mecanismos de afrontamiento y el apoyo social disponible desempeñan un papel decisivo ([Afshar et al. 2015](#); [De La Fuente, 2018a](#)). No obstante, y a pesar del hecho de que la mayoría de los estudios que vinculan factores estresantes con una respuesta fisiológica o enfermedad particular reconocen la importancia de la evaluación subjetiva del evento por el individuo ([Kristensen, 1996](#); [Schwartz et al. 1996](#); [Cohen et al. 1997](#)), este factor no ha sido tenido en cuenta en los mismos. Por ello, para dar respuesta al **primer sub-objetivo: ¿Los parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio se ven alterados en mujeres que presentan un alto grado de estrés percibido?**, se investigaron una serie de funciones inmunitarias y parámetros de estrés oxidativo e inflamatorio en un grupo de mujeres de mediana edad (30-50 años) agrupadas en función de sus niveles de estrés percibido, según sus puntuaciones en la Escala de Estrés Percibido (EEP) (del inglés, “*Perceived Stress Scale*”: PSS).

Los resultados de este **primer sub-objetivo** demuestran que el grado de estrés percibido de una persona, independientemente del tipo, la intensidad y la duración del factor estresante al que haya estado sometido, tiene un profundo impacto en la función de sus células inmunitarias, así como en el estado de oxidación e inflamación y, por tanto, sobre la velocidad de envejecimiento. Dado que el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HAA) es fundamental para la homeostasis del sistema inmunológico, las alteraciones en su funcionamiento se han asociado

con distintas patologías. Así, una activación excesiva del eje HHA ha sido relacionada con un aumento en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, mientras que su represión se ha asociado con un aumento en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes (Bauer, 2005). En este contexto, se ha descrito que las hormonas suprarrenales, como la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) y, especialmente, el cortisol, entre otras, son importantes mediadores en esta señalización que va a modular los efectos sobre la función inmune (Butcher et al. 2005). En general, la DHEA-S se ha descrito como un potenciador de la respuesta inmunológica, mientras que el cortisol como supresor (Butford et al. 2008). En consecuencia, ciertas situaciones de estrés crónico que se traducen en un aumento en la cantidad de cortisol, se han relacionado con una menor actividad NK, una capacidad linfoproliferativa más baja y una producción de anticuerpos alterada en respuesta a la vacunación (Herbert y Cohen, 1993; Kiecolt-Glaser et al. 1984; Cohen et al. 2001). De acuerdo con esto, el mayor cociente cortisol/DHEA-S observado en plasma de mujeres con niveles altos de estrés percibido en comparación con aquellas con bajo grado de estrés percibido, explicaría el hecho de que presenten una peor funcionalidad de sus células inmunitarias, evidenciado en la actividad NK, en la capacidad quimiotáctica de neutrófilos y linfocitos, en la fagocítica de neutrófilos y en la proliferativa de linfocitos. Sin embargo, mientras que las mujeres con grado de estrés percibido alto presentaban todas las funciones inmunes investigadas alteradas, las mujeres con grado de estrés percibido moderado sólo tenían afectadas las funciones de los neutrófilos. Este hallazgo fue sorprendente dado que se ha descrito previamente que los neutrófilos eran menos sensibles a las acciones supresoras de los glucocorticoides (Saffar et al. 2011). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la activación de los neutrófilos también se ve modulada por el estrés psicológico, conduciendo a un mayor o menor grado de activación en función de la duración y el tipo de estrés (Ellard et al. 2001; Kereszter et al. 2007; Hirsch et al. 2012). Los resultados del presente objetivo, sugieren que la funcionalidad de los neutrófilos parece ser más sensible a cualquier grado de estrés percibido que la de los linfocitos. De hecho, el deterioro de la funcionalidad de estas células en mujeres con estrés percibido moderado, coincide con la mayor cantidad de daño oxidativo que presentan los neutrófilos, en comparación con los linfocitos en estas mujeres. Dado que el funcionamiento adecuado de las células inmunitarias se basa en el mantenimiento de un adecuado equilibrio redox (De La Fuente y Miquel, 2009), el mayor daño oxidativo de estas células explicaría su peor funcionalidad.

Por otro lado, dado que las citoquinas son moduladores esenciales de las interacciones que regulan la inmunidad humoral y celular, las alteraciones en su liberación podrían también desempeñar un papel crucial en el deterioro observado en la función inmunológica. Así, las

células inmunitarias de mujeres con grado de estrés percibido moderado y alto, cuando se enfrentan a una infección, imitada con la presencia del LPS, mostraron una mayor liberación de citoquinas pro-inflamatorias y una menor liberación de anti-inflamatorias, de acuerdo con lo observado en estudios previos ([Sribanditmongkol et al. 2015](#)). Además, con respecto a la liberación de citoquinas en ausencia de estimulación, la cual es un indicador de inflamación estéril ([Bauer y De La Fuente, 2016](#)), se encontró que las mujeres con estrés moderado y alto muestran una liberación basal más elevada de citoquinas pro-inflamatorias y menor de anti-inflamatorias. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se han encontrado mayores concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α , en plasma de mujeres ansiosas ([Maes et al. 1998](#), [Arranz et al. 2007](#)). Este balance pro-inflamatorio/anti-inflamatorio alterado puede tener efectos perjudiciales graves dado que el aumento en la señalización pro-inflamatoria puede promover la generación de ROS y provocar daño oxidativo, ya que el estrés oxidativo e inflamatorio son procesos muy relacionados ([Vida et al. 2014](#); [De la Fuente, 2018a](#)). De hecho, se demostró que un grado moderado y alto de estrés percibido se asociaba con valores más bajos en las defensas antioxidantes (actividad de GPx y GR, y concentración de GSH) y más altos en los parámetros oxidantes (concentración de GSSG y MDA, y cociente GSSG/GSH) analizados en sangre total. Estos valores fueron similares a los observados en individuos de edades avanzadas (como se recoge en el primer objetivo), a pesar de que todas las mujeres del presente sub-objetivo eran de mediana edad (30-50 años). Estos resultados concuerdan con los de otros estudios que han observado una asociación entre el grado de estrés percibido y el daño oxidativo al ADN en orina ([Shimano et al. 2018](#)), el daño oxidativo al ADN en leucocitos ([Irie et al. 2001](#); [Irie et al. 2003](#)) y con la cantidad de isoprostanos en plasma ([Epel et al. 2004](#)).

En el contexto de la comunicación neuroinmunoendocrina, se ha descrito que una respuesta inadecuada al estrés causa un envejecimiento acelerado ([Perna et al. 2015](#); [De la Fuente, 2018a](#)). Así, se ha observado que los individuos con estrés crónico muestran un acortamiento telomérico acelerado ([Epel et al. 2004](#)). Respaldando esta idea, en el presente sub-objetivo se encontró una correlación positiva entre los niveles de estrés percibido (puntuaciones en la escala de estrés percibido) y la edad biológica (estimada a través de un modelo matemático basado en los parámetros de función inmunitaria investigados) de las mujeres, a pesar de que todas pertenecían al mismo grupo de edad (30-50 años). Así, estos resultados sugieren que la inmunosenescencia y el estrés oxidativo e inflamatorio que tiene lugar en mujeres con niveles de estrés percibido moderado y alto, de acuerdo con la teoría de la oxidación e inflamación del envejecimiento ([De La Fuente y Miquel, 2009](#)), acelera la velocidad de envejecimiento de estas mujeres ([De La Fuente, 2018a](#)). Una limitación del estudio es que no se tuvo en cuenta la

naturaleza objetiva o la magnitud de los factores estresantes a los que se enfrentaban las mujeres incluidas en el estudio, los cuales podrían ser muy diferentes. Sin embargo, en un estudio realizado en mujeres, todas ellas sometidas al mismo factor estresante, el cuidar de un cónyuge discapacitado, demostró que los efectos finales sobre la salud no dependían de la naturaleza del factor estresante, que era el mismo, sino más bien de la percepción y de los mecanismos de afrontamiento de las mujeres que se enfrentaban a dicho estrés (Beach et al. 2000).

Dado que el grado de estrés percibido es el balance resultante entre los estresores diarios, los eventos vitales, así como de los medios y recursos de los cuales la persona disponga en un determinado momento (Remor, 2006), supone una medida de la capacidad de respuesta al estrés. De acuerdo con esto, Pedrero-Pérez y colaboradores (2015), demostraron que un elevado grado de estrés percibido estaba relacionado con conductas de evitación, las cuales, en definitiva, manifestarían una inadecuada respuesta al estrés. Por tanto, los resultados del presente sub-objetivo demuestran que una respuesta inadecuada al estrés tiene un profundo impacto en el estado del estrés oxidativo e inflamatorio, así como en la capacidad funcional de las células inmunitarias. Por lo tanto, cuanto mayor es el estrés percibido, mayor es el estrés oxidativo e inflamatorio y peor es la función inmunológica. Además, los altos niveles de estrés percibido parecen estar asociados con un envejecimiento acelerado y, en consecuencia, con una mayor edad biológica, que (a largo plazo, si no se hace ninguna intervención) conlleva una menor esperanza de vida.

En cuanto al **segundo sub-objetivo: ¿Los parámetros de estrés oxidativo en células de sangre periférica pueden ser utilizados como marcadores prodrómicos de la enfermedad de Alzheimer?**, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA), presentaban una inmunidad deteriorada y mayores niveles de GSSG y MDA, respecto a controles sanos de su misma edad (Vida et al. 2018). Por ello, nos planteamos investigar una batería completa de parámetros de estrés oxidativo en sangre periférica de individuos que presentan deterioro cognitivo leve (DCL) e individuos con Alzheimer, con el fin de poder encontrar marcadores prodrómicos de la EA.

En este caso, nos centramos en el estudio de parámetros de estrés oxidativo ya que, en la EA, el estrés oxidativo es uno de los primeros eventos que ocurren antes del inicio de los síntomas y se ha reconocido como un contribuyente esencial tanto en la patogénesis como en la progresión de la enfermedad (Nunomura et al. 2001; Zhu et al. 2007; Luca et al. 2015). Pero, además, este aumento de estrés oxidativo no tiene lugar sólo en el cerebro, sino que también

puede ser detectado a nivel periférico. En este sentido se han encontrado mayores niveles de MDA, isoprostanos y proteínas carboniladas en suero procedente de pacientes con EA en relación a controles sanos (Sinem et al. 2010). El hecho de poder detectar marcadores prodrómicos de la EA en sangre periférica tiene múltiples ventajas, como lo es el ser una muestra de fácil obtención en el ámbito clínico, el hecho de que no requiere de técnicas invasivas para su obtención, en comparación con el análisis de líquido cefalorraquídeo, y supondría un menor coste que las actuales técnicas de neuroimagen. Por ello, los parámetros de estrés oxidativo determinados en sangre periférica tienen potencial para ser usados como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la EA. Sin embargo, su uso tiene una serie de limitaciones, como el hecho de que otras enfermedades que cursan con un aumento en la producción de radicales libres, como la diabetes o las enfermedades cardiovasculares, pueden interferir en los valores de los parámetros de estrés oxidativo obtenidos en la sangre. Esto podría explicar el hecho de que los resultados existentes en cuanto a marcadores de estrés oxidativo en la EA, hayan sido contradictorios (Skoumalová y Hort, 2012). Otra de las causas que han llevado a la obtención de resultados contradictorios en relación a marcadores periféricos de estrés oxidativo en la EA, es el uso de diferentes tipos de muestra para las determinaciones, entre las que se incluyen: plasma, suero, leucocitos mononucleares de sangre, eritrocitos aislados o células sanguíneas totales (incluyendo leucocitos y eritrocitos). De hecho, la mayoría de los estudios hasta la fecha se han centrado en la cuantificación de parámetros de estrés oxidativo en muestras de plasma y suero (Cecchi et al. 2002; Ozcankaya y Delibas, 2002; Polidori y Mecocci, 2002; Aybek et al. 2007; Greilberger et al. 2008; Casado et al. 2008; Martín-Aragón et al. 2009; Sinem et al. 2010; Perrotte et al. 2019). Sin embargo, el estado redox del plasma está muy influenciado por la dieta, y la mayoría de los sistemas y compuestos de defensa enzimáticos antioxidantes son intracelulares. Por ello, en este sub-objetivo se procedió al estudio de células sanguíneas totales ya que este tipo de muestra es clínicamente más factible, reproducible, rentable, fácil de implementar y aplicar, en comparación con las poblaciones de células inmunitarias purificadas y aisladas de sangre periférica (Vida et al. 2018). Asimismo, estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que el estado redox de la sangre completa se correspondía con el estado redox de los neutrófilos aislados (Vida et al. 2018).

En general, los resultados de este sub-objetivo resaltan la existencia de un estado redox alterado en las células de la sangre de pacientes con EA y, curiosamente, algunos de los parámetros de estrés oxidativo analizados ya se encuentran afectados en los pacientes con DCL. Los resultados demostraron que los pacientes con EA, sin distinguir entre hombres y mujeres, tienen una actividad CAT más alta, mayores concentraciones de GSSG y MDA, así como del

cociente GSSG/GSH, mientras que presentan actividades GPx y GR más bajas y menor concentración de GSH, en comparación con los controles de la misma edad. Además, se demostró que los pacientes con DCL tienen una mayor actividad CAT y concentración del cociente GSSG/GSH y MDA, y menores actividades de GPx y GR que los controles sanos de la misma edad.

Respecto a las actividades de las enzimas antioxidantes que se han analizado, y que constituyen una primera línea de defensa frente a la generación de radicales libres, hay que tener en cuenta que el que se encuentren con mayor o menor actividad en un individuo, puede depender de que sean más inducidas por la situación de estrés oxidativo del mismo o que se encuentren consumidas por tener que ser utilizadas en la neutralización de los oxidantes (Cherubini et al. 2005). Los resultados mostraron que la **actividad SOD** era similar en los pacientes con DCL y EA y en los individuos controles, lo que concuerda con resultados previos (Sulkava et al. 1986; Jeandel et al. 1989; Gilca et al. 2014). No obstante, al subdividir cada grupo por sexo, se encontró una mayor actividad de SOD en mujeres con EA en comparación con sus respectivos controles. Otros estudios también han descrito una mayor actividad SOD en eritrocitos de pacientes con EA al analizar la población total, que consistía principalmente en mujeres (Perrin et al. 1990; Rossi et al. 2002).

Con respecto a la **actividad CAT**, tanto los pacientes con DCL como con EA mostraron una mayor actividad, que también se ha descrito en otros estudios (Perrin et al. 1990; Torres et al. 2011). Esta mayor actividad enzimática probablemente podría ser un mecanismo compensatorio para contrarrestar el aumento de H_2O_2 que se ha descrito en estos pacientes. Por el contrario, se encontró que la **actividad GPx** era menor en los pacientes con DCL y EA en comparación con los sujetos control, también concordando con los resultados de estudios previos (Sulkavá et al. 1986). Tanto la actividad CAT como GPx catalizan la conversión de H_2O_2 en agua. La pregunta es ¿por qué aumenta la actividad de CAT y disminuye la GPx en pacientes con DCL y EA? Desde un punto de vista cinético, la enzima GPx tiene una afinidad mucho mayor por el H_2O_2 que la CAT, por lo tanto, el H_2O_2 es neutralizado principalmente por la GPx en condiciones normales. Sin embargo, cuando la concentración de H_2O_2 aumenta, como en condiciones oxidativas severas, la enzima CAT aumenta concomitantemente (Michiels et al. 1994). Además, la enzima CAT media la conversión de H_2O_2 en agua sin requerir equivalentes reductores adicionales y, por lo tanto, no consume energía de la célula (Day, 2009). Por lo tanto, esta podría ser la razón por la cual la actividad CAT aumenta y la actividad GPx disminuye tanto en pacientes con DCL como en pacientes con EA. Se ha descrito también que la GPx cataliza la reducción de peróxidos lipídicos además de la del H_2O_2 . De hecho, se demostró hace tiempo que

la GPx protege las membranas biológicas al prevenir la propagación de la peroxidación lipídica (McCray et al. 1976).

Por lo tanto, la menor actividad GPx observada en las células sanguíneas de los pacientes con DCL y EA agravaría la acumulación de productos de peroxidación lipídica. De hecho, en el presente sub-objetivo, se encontró que los pacientes con DCL y EA presentaban mayor **concentración de MDA** que sus respectivos controles. Dado que la peroxidación lipídica es un indicador de daño oxidativo, se ha propuesto como uno de los marcadores más prometedores en el diagnóstico de la EA (Rani et al. 2017). Algunos autores han sugerido que la peroxidación lipídica en el cerebro podría ser uno de los factores responsables del deterioro cognitivo, y se ha descrito una correlación negativa entre la concentración de MDA en plasma y el estadio de Alzheimer (Marcourakis et al. 2008; Torres et al. 2011; Skoumalová y Hort, 2012; Rani et al. 2017). Sin embargo, en este sub-objetivo no encontramos asociación entre la concentración de MDA en las células sanguíneas y las puntuaciones del MMSE, lo que podría deberse a la falta de pacientes con EA en estadios más avanzados de la enfermedad.

Por otro lado, el ciclo del glutatión constituye uno de los mecanismos intracelulares más importantes que desempeñan un papel clave en la preservación de un estado redox adecuado (Drögue y Breitkreutz, 2000). En el presente estudio, los pacientes con EA mostraron una menor **actividad GR** y **concentración de GSH**, junto con mayor **concentración de GSSG** y **cociente GSSG/GSH**. Sin embargo, los pacientes con DCL sólo presentaron una menor actividad GR en comparación con los controles de su misma edad, en ambos sexos. Por lo tanto, estos resultados parecen sugerir que esta actividad se deteriora en las primeras etapas de la enfermedad, mientras que en las etapas más avanzadas de la EA se produce una acumulación de GSSG y un agotamiento de GSH. Curiosamente, los parámetros involucrados en el ciclo de glutatión como GR, GSH, GSSG, GSSG/GSH, fueron los más directamente relacionados con el grado de deterioro cognitivo, determinado a través de la escala del MMSE, lo que está de acuerdo con lo encontrado en otros estudios (Bermejo et al. 2008; Ponce et al. 2014).

Con respecto a la prevalencia de la EA, se sabe que su incidencia es mayor en las mujeres que en los hombres y estas diferencias no pueden atribuirse simplemente a la mayor longevidad de las mujeres, porque la prevalencia también es mayor en edades más jóvenes (Viña y Lloret, 2010). Por lo tanto, debe existir algún mecanismo patogénico específico para explicar esa mayor incidencia de casos de EA en las mujeres. Los resultados del presente estudio demuestran que, en ausencia de patología, existen diferencias estadísticamente significativas en las actividades de las enzimas antioxidantes debidas al sexo, las cuales ya no se detectan en los individuos con

DCL y EA. Se ha sugerido que esas diferencias podrían estar relacionadas con el papel de las hormonas sexuales. De hecho, se sabe que los estrógenos aumentan la expresión de SOD y GPx (Viña y Lloret, 2010). Sin embargo, las mujeres posmenopáusicas experimentan una fuerte disminución de los estrógenos, mientras que los hombres, generalmente, van disminuyendo su testosterona con la edad de forma gradual (Morley et al. 1997). Esta diferencia podría explicar, en parte, por qué las mujeres son más vulnerables al estrés oxidativo en edades avanzadas y por qué la incidencia de la EA es más alta en las mujeres que en los hombres. De todas formas, a pesar de no haber encontrado diferencias debidas al sexo entre los individuos con DCL y EA, se observó que mientras que las alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidantes fueron más significativas en los hombres que en las mujeres con EA en comparación con sus respectivos controles, el aumento en los compuestos oxidantes fue más significativo en las mujeres que en los hombres con EA. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el aumento de los productos de daño oxidativo encontrado en las mujeres con EA no es el resultado de un sistema de defensa antioxidante deteriorado, sino más bien la consecuencia de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, como se ha sugerido previamente (Schuessel et al. 2004). De acuerdo con esto, se ha descrito que las mitocondrias de ratones hembra viejas producen más ROS en presencia de péptido β A que las procedentes de ratones machos viejos (Viña y Lloret, 2010).

Además de la edad y el sexo, la presencia del alelo ϵ 4 en el gen de la apolipoproteína E (APOE) ha sido reconocida como un factor de riesgo importante en la EA esporádica (Strittmatter et al. 1993; Tilley et al. 1998; Raygani et al. 2005). Sin embargo, su relación con el estrés oxidativo es controvertida. Ciertos estudios han encontrado una relación entre el genotipo APOE del alelo ϵ 4 y marcadores periféricos de daño oxidativo en plasma, como mayores cantidades del radical hidroxilo (Ihara et al. 2000) y de MDA (Aybek et al. 2007). No obstante, en otros estudios no se han encontrado diferencias (Rinaldi et al. 2003), al igual que ha sucedido con los resultados del presente sub-objetivo, aunque la falta de diferencias estadísticamente significativas en nuestro estudio podría deberse a la pequeña cantidad de pacientes con el alelo ϵ 4 en APOE.

En conclusión, los resultados del presente sub-objetivo demuestran que algunos marcadores de estrés oxidativo están alterados en sangre de individuos con EA (menor actividad GPx y GR y concentración de GSH, así como mayor actividad CAT, cociente GSSG/GSH y concentración de MDA) con respecto a los controles de la misma edad, en ambos sexos. Curiosamente, algunos de estos marcadores también estaban alterados en pacientes con DCL (como las actividades GPx y GR y la concentración de MDA) en ambos sexos y, por lo tanto, podrían usarse para el diagnóstico temprano de la EA. Además, se encontró que otros marcadores redox, como la actividad GR, las concentraciones de GSH y GSSG y el cociente

GSSG/GSH en sangre se asocian con el grado de deterioro cognitivo. Aunque estas asociaciones fueron modestas debido al pequeño tamaño de la muestra incluida en el presente sub-objetivo, nuestros datos resaltan la importancia y el impacto del estado redox periférico y los sistemas homeostáticos durante el deterioro cognitivo temprano que conduce a la demencia. Por ello, dada la facilidad de obtención del tipo de muestra utilizado y la simplicidad de los ensayos realizados, se puede sugerir, para su utilización en el ámbito clínico, la valoración conjunta de algunos parámetros redox en células sanguíneas totales, como pueden ser las actividades GPx y GR y la concentración de MDA, como marcadores prodrómicos de la EA. Otros parámetros, como la actividad GR, las concentraciones de GSH y GSSG y el cociente GSSG/GSH parecen tener potencial en la monitorización de la progresión de la EA, una vez que se establece la patología. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos resultados son preliminares y que se deberían llevar a cabo muchos más estudios en los que se tendrían que incluir diseños longitudinales para dilucidar la relación existente entre estos marcadores y la progresión de la enfermedad. No obstante, lo aportado en la presente tesis puede proporcionar un punto de referencia para futuras investigaciones destinadas a encontrar marcadores prodrómicos de la enfermedad de Alzheimer.

Para dar respuesta a la pregunta planteada en el **tercer sub-objetivo: ¿Qué parámetros de función inmunitaria, estado redox e inflamatorio pueden ser predictivos de supervivencia tras un ingreso hospitalario en individuos centenarios, e indicadores de recuperación?** se procedió al estudio de una batería de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio en un grupo de centenarios hospitalizados y se investigó la validez de los mismos como predictores de supervivencia. Con respecto a los parámetros de función inmunitaria, los centenarios que sobrevivieron mostraron una mejor función inmunitaria, evidenciada por una menor adherencia de neutrófilos y linfocitos, una mayor quimiotaxis y capacidad microbicida de los neutrófilos, una mayor actividad NK y linfoproliferación en respuesta a PHA, en comparación con los que no sobrevivieron. Pese a que varios estudios previos han encontrado que algunos de estos parámetros predicen la mortalidad en personas de edades avanzadas ([Wayne et al. 1990](#); [Ferguson et al. 1995](#); [Ogata et al. 1997](#), [Ogata et al. 2001](#), [Wikby et al. 2005](#)), este es el primer estudio en el que se demuestra que los parámetros de función de las células inmunitarias pueden ser usados como predictores de supervivencia y mortalidad en centenarios.

Con respecto a la liberación de citoquinas de las células mononucleares en respuesta a la estimulación con PHA, se observó que los centenarios que sobrevivían mostraban una mayor liberación de IL-1 β e IL-6, en comparación con el grupo de no supervivientes. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en el que se encontró que los centenarios sanos o

independientes producían mayor cantidad de IL-1 β y TNF- α después de la estimulación, en comparación con los que eran dependientes (Miyaji et al. 2000). También, se ha comprobado que las personas de más de 85 años que producen menos TNF- α en respuesta a un estímulo tienen el doble de probabilidades de morir en comparación con los que presentan una mayor liberación (Van den Biggelaar et al. 2004).

Debe tenerse en cuenta que la producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a un estímulo es necesaria para llevar a cabo una respuesta inmune apropiada y, como tal, refleja la capacidad funcional de las células inmunitarias. Por el contrario, la liberación de citoquinas de esas células en ausencia de un estímulo contribuiría a la inflamación crónica de bajo grado asociada con el envejecimiento (Bauer y De La Fuente, 2016), y que constituye la denominada “*inflammaging*” (Franceschi et al. 2000a), que se considera un factor de riesgo crítico tanto para la morbilidad como para la mortalidad en ancianos (Bruunsgaard et al. 2001; 2003b; De Martinis et al. 2006; Giovannini et al. 2011; Franceschi y Campisi, 2014; Franceschi et al. 2017a). Sin embargo, en todos estos estudios las citoquinas fueron medidas en plasma o suero, por lo que pueden provenir de diferentes tejidos y células (tejido adiposo, músculo, células endoteliales, fibroblastos estromales y dérmicos, linfocitos, macrófagos, células madre, etc.). Dado que se ha sugerido que los efectos perjudiciales de la inflamación van a depender, principalmente, de la localización y tipo de células donde se produce y actúe (Salvioli et al. 2013), en este sub-objetivo nos centramos en el estudio del papel predictivo de la liberación de citoquinas de las células mononucleares de la sangre. Los resultados mostraron que los supervivientes tenían, al momento del ingreso, una menor liberación basal de TNF- α junto con una liberación basal mayor de IL-10 en comparación con los no supervivientes. Estos resultados sugieren que cuanto más baja sea la liberación basal de TNF- α y más alta sea la de IL-10 por parte de las células inmunitarias en los centenarios, mayor es la probabilidad de supervivencia.

Es importante recordar que los centenarios, además de mostrar un excelente perfil inmunológico, también muestran un mejor perfil redox que los individuos ancianos, pero de menor edad que ellos. En el primer objetivo de la presente tesis, se demostró que los centenarios exhiben una “*firma redox*” única, caracterizada por valores bajos en los parámetros oxidantes y muy elevados en las defensas antioxidantes, en comparación con individuos de otras edades. En el presente sub-objetivo, aquellos centenarios que sobrevivieron también mostraron un menor estrés oxidativo, evidenciado por una mayor actividad GR y menor concentración de anión superóxido y MDA, en comparación con los centenarios que murieron. Estos resultados concuerdan con un estudio previo realizado en centenarios en el que aquellos que tenían una mejor capacidad funcional física también tenían una mayor actividad GR (Andersen et al. 1998).

Además, se establecieron valores de referencia para los parámetros investigados y se calcularon los "ODDS RATIO", que en español se traduciría como "razón de momios". En términos estadísticos, el ODDS RATIO se define como la posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro. Así, se calculó la probabilidad de supervivencia para aquellos centenarios que tenían un valor por encima del punto de corte establecido para un parámetro determinado, respecto a la probabilidad de supervivencia que presentaban aquellos centenarios que presentaban un valor por debajo del punto de corte establecido para dicho parámetro. En base a esto, se encontró que la probabilidad de supervivencia a los 3 meses del ingreso aumentó significativamente con una mayor quimiotaxis de neutrófilos (> 170 Índice de quimiotaxis, $P < 0,05$), actividad microbicida ($> 190\%$, $P < 0,001$), actividad NK ($> 77\%$, $P < 0,001$), linfoproliferación estimulada con PHA ($> 242\%$, $P < 0,001$), liberación basal de IL-6 (> 950 pg / mL, $P < 0,001$) e IL-10 (> 700 pg / mL, $P < 0,001$), liberación estimulada por PHA de IL-1 β (> 1500 pg / mL, $P < 0,05$) e IL-6 (> 850 pg / mL, $P < 0,001$) y actividad de glutatión reductasa (> 248 U GR / mg de proteína, $P < 0,001$). Por su parte, la probabilidad de supervivencia aumentó significativamente con una menor adherencia de los neutrófilos ($> 33\%$, $P < 0,001$), liberación basal de TNF- α (> 202 pg / mL, $P < 0,001$) y concentración de anión superóxido intracelular (> 43 nmol NBT / mg de proteína, $P < 0,001$) y MDA (> 3.19 nmol MDA / mg de proteína, $P < 0,001$).

Los mismos parámetros que se valoraron en los centenarios al momento de su ingreso en el hospital, fueron determinados en el grupo de los que sobrevivieron, una vez transcurridos 3 meses, para investigar el papel potencial de los mismos como indicadores de recuperación. Se observó que, aunque la mayoría de los parámetros analizados no cambiaron dentro de este marco de tiempo, algunos como la capacidad quimiotáctica de neutrófilos y linfocitos, la fagocítica de neutrófilos y la actividad enzimática GPx aumentaron en estos sujetos durante el período de recuperación. Estos valores fueron, a su vez, comparados con los encontrados en centenarios que no habían sido hospitalizados en el último año, que sirvieron de controles. Se pudo comprobar que la capacidad fagocítica era todavía menor tras el período de recuperación que la que presentaban los centenarios utilizados como controles, mientras que la actividad GPx era mayor. No obstante, las capacidades de quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos sí que alcanzaron valores similares a los observados en centenarios controles, por lo que estos parámetros podrían ser utilizados como indicadores de recuperación.

En resumen, los resultados del presente sub-objetivo proporcionan valores de referencia para una serie de marcadores, como la adherencia de los neutrófilos, la quimiotaxis y la actividad microbicida, la actividad NK, la linfoproliferación estimulada por PHA, la liberación

basal de IL-6, TNF- α y IL-10; la liberación en respuesta a PHA de IL-1 β e IL-6, la actividad GR y la concentración de anión superóxido y MDA, que pueden potencialmente ser utilizados en el ámbito clínico como predictores de supervivencia en centenarios. Como limitación del estudio podría indicarse que solo se registró la mortalidad total y, por lo tanto, no fue posible investigar la asociación de estos marcadores con una causa específica de fallecimiento. Como punto fuerte del estudio estaría el hecho de poder proponer marcadores predictores de supervivencia, aunque nuestra población estudiada representaba un grupo muy heterogéneo de sujetos, con muy diferentes causas de ingreso. Dado que los datos se analizaron retrospectivamente, se necesitan futuros estudios prospectivos para validar los hallazgos del presente sub-objetivo utilizando una muestra más grande. Dado que el número de personas centenarias está aumentando rápidamente en todo el mundo, la identificación de marcadores que permitan evaluar el estado de salud, así como predecir el riesgo de mortalidad de estos individuos, son cuestiones importantes de salud pública. En consecuencia, los resultados del presente sub-objetivo, aunque preliminares, resaltan la utilidad de la función inmunitaria y los marcadores de estrés oxidativo-inflamatorio en la predicción de la supervivencia a corto plazo después del ingreso hospitalario en centenarios y proporcionan un nuevo punto de referencia para futuras investigaciones encaminadas a establecer índices de riesgo de mortalidad en esta población.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Cambios funcionales y de estado redox e inflamatorio en las células inmunitarias con el envejecimiento:

En primer lugar (Artículo 1), se verificó que una serie de parámetros de función analizados en células inmunitarias disminuían a medida que avanza el proceso de envejecimiento, disminución que tenía lugar hasta alcanzar la esperanza de vida media de la especie (tanto en humanos como en ratones). Además, en ratones adultos envejecidos prematuramente (PAM), dichas funciones inmunitarias se encontraban con valores más similares a los que se observan en ratones cronológicamente viejos, y estos PAM presentaban una menor longevidad que aquellos animales que mostraron una adecuada funcionalidad inmunitaria en la edad adulta.

Del mismo modo, se ratificó que a medida que se avanza en el proceso de envejecimiento, la mayoría de las defensas antioxidantes disminuían mientras que los compuestos oxidantes aumentaban, tanto en las células inmunitarias de ratones como de humanos, hecho que también ocurría hasta alcanzar la esperanza de vida media en ambas especies. Además, aquellos ratones adultos que presentaban unos parámetros redox con valores similares a los observados en ratones viejos, tenían una menor longevidad (Artículo 2).

Dado que el correcto funcionamiento de las células inmunitarias depende del adecuado balance de compuestos oxidantes y antioxidantes ([De la Fuente y Miquel 2009](#); [De la Fuente, 2018a](#)), tiene sentido que las alteraciones en el estado redox asociadas a la edad que experimentan estas células sean coincidentes con el deterioro funcional de las mismas. Hay que tener en cuenta, además, que según la teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento, el deterioro funcional del sistema inmunitario va a contribuir al aumento de compuestos oxidantes, incidiendo en la velocidad a la que el individuo envejece y determinando su longevidad ([De la Fuente y Miquel, 2009](#)).

Adicionalmente, el aumento del estrés oxidativo en las células inmunitarias a lo largo del envejecimiento va a generar un aumento del estrés inflamatorio, dado que la oxidación y la inflamación son procesos íntimamente relacionados ([Vida et al. 2014](#); [De la Fuente, 2018a](#)). De este modo, una respuesta pro-inflamatoria exacerbada por parte de las células inmunitarias puede, además de generar daño, llevar a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, a su vez, recluten otras células inflamatorias que produzcan más ROS que, al activar distintas vías de señalización que convergen en la producción de compuestos pro-inflamatorios, amplifiquen el daño celular ([Ryan et al. 2004](#); [Bartsch y Nair, 2006](#); [Khansari et al. 2009](#)).

De acuerdo con esto, se constató (Artículo 3) en ratones que a medida que los animales envejecen, se produce por parte de las células inmunitarias, en situación basal, es decir, en ausencia de estimulación, un aumento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y una disminución de las anti-inflamatorias. De hecho, en estas condiciones basales los linfocitos aumentaron su capacidad de proliferación al avanzar la edad. Dado que esta capacidad se relaciona con una mayor producción de oxidación (Schieber y Chande, 2014), estos resultados demuestran que el sistema inmunitario al envejecer se encuentra sobreactivado en lo que respecta a la liberación de compuestos oxidantes e inflamatorios. Como se ha comentado antes, esto incidiría en una mayor velocidad de envejecimiento del individuo. Cuando se simuló una estimulación antigénica mediante el uso del mitógeno Con A, se observó que las células inmunitarias al envejecer no son capaces de responder a dicho estímulo mediante el aumento de su proliferación ni de una mayor liberación de citoquinas pro-inflamatorias, lo cual sería necesario para una eficiente respuesta inmunitaria. Esto justificaría el hecho de que, al avanzar la edad, los individuos sean más vulnerables a distintos procesos infecciosos.

De este modo, el proceso conocido como inmunosenescencia, engloba tanto el concepto de “parálisis inmunitaria” como el de “sobreactivación” e “*inflammaging*”, aunque puedan parecer hechos contradictorios. Así a medida que el individuo envejece, por un lado, experimenta un deterioro en la capacidad de respuesta de las células inmunitarias ante un agente extraño (tanto de las células de la inmunidad innata y adquirida), mientras que, por otro, experimenta una mayor activación en estado basal. Dado que el término senescencia se asocia únicamente con pérdida de funcionalidad, ciertos autores han señalado que el término de “remodelación inmunitaria” sería más adecuado que el de inmunosenescencia para describir los cambios que acontecen en el sistema inmunitario al envejecer (Fulop et al. 2016; 2018).

En este contexto, investigaciones previas han sugerido que la causa de que se desencadene con la edad este aumento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias de forma basal, podría ser la exposición prolongada a infecciones virales persistentes que ha experimentado el individuo a lo largo de su envejecimiento. Por ello, la situación será diferente dependiendo de la historia clínica del sujeto, lo que va a constituir lo que se ha denominado su “inmunobiografía” (Grignolio et al. 2014, Franceschi et al. 2017b). Por otro lado, cada vez más estudios apuntan a que serían los restos celulares y las moléculas dañadas o mal plegadas las que jugarían un papel más dominante en el aumento del “*inflammaging*”. De este modo, ha sido propuesto que la inflamación asociada a la edad es en gran medida la consecuencia del desequilibrio entre la producción y la eliminación de residuos celulares y de moléculas mal plegadas, que se acumulan con el paso de los años (Franceschi et al. 2017a; 2017b). Estos

residuos celulares y moléculas dañadas serían capaces de promover la inflamación al ser reconocidos por los PRR (del inglés, "*Pattern Recognition Receptors*") y, por lo tanto, la prolongada exposición a estas moléculas conduciría a respuestas inflamatorias no deseadas o innecesarias.

Son muchos los mecanismos propuestos como responsables del aumento asociado a la edad en los niveles de compuestos pro-inflamatorios, conocido como "*inflammaging*". Entre ellos, los más estudiados han sido el "inflammasoma" y la activación crónica del factor de transcripción NF- κ B, el cual regula la expresión de variedad de citoquinas pro-inflamatorias. De hecho, en estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la activación de dicho factor aumenta con la edad en leucocitos peritoneales de ratón (Arranz et al. 2010a). En este contexto, se planteó la hipótesis de que la proteína Hsp70, dado que juega un papel fundamental asegurando el correcto plegamiento de proteínas dañadas, ayudando a su degradación a través del proteasoma, y que también participa regulando el estado de activación/inactivación del factor de transcripción NF- κ B (Guzhova et al. 1997; Zheng et al. 2008), podría ser utilizada como marcador de la velocidad de envejecimiento del individuo.

Siguiendo esta idea, se demostró que (Artículo 4), al avanzar la edad, tiene lugar una disminución en la concentración de Hsp70 tanto en leucocitos peritoneales como en tejidos post-mitóticos, mientras que en los tejidos mitóticos se observó un aumento de la misma. Por otro lado, aquellos ratones que en la edad adulta tenían concentraciones más similares a las observadas en la vejez, presentaban una menor longevidad. Todo ello demuestra el papel esencial que juega esta proteína en el proceso de envejecimiento. En el contexto que nos atañe, se ha comprobado que la Hsp70 puede actuar a muchos niveles en la vía de señalización del NF- κ B para inhibir o amortiguar su activación (Guzhova et al. 1997; Zheng et al. 2008, Martínez de Toda et al. 2015). De acuerdo con esto, la disminución de la concentración de Hsp70 en las células inmunitarias de los ratones viejos podría ser un mecanismo subyacente importante que contribuyese a la activación persistente de NF- κ B, y, por ende, a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias de forma crónica con la consiguiente aceleración del proceso de envejecimiento.

- Estado inmunitario, redox e inflamatorio en individuos longevos:

Es indudable que para un mejor conocimiento de los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento, es de gran interés el estudio de aquellos individuos que han logrado alcanzar edades cercanas a los límites de la longevidad máxima de su especie.

De este modo, se demuestra que los individuos que alcanzan una elevada longevidad, tanto humanos como ratones (Artículo 1-3), presentan la mayoría de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio con valores más similares a los observados en la edad adulta que a los de edades avanzadas. Así, los resultados de la presente tesis coinciden con estudios previos que demuestran que los centenarios tienen una capacidad funcional de sus células inmunitarias preservada ([Alonso-Fernández et al. 2008](#); [Borras et al. 2016](#)). Sin embargo, todos estos resultados derivados de estudios transversales, llevaron a pensar que los sujetos longevos son súper individuos que no sucumben al proceso de envejecimiento y que mantienen una funcionalidad inmunitaria óptima a lo largo de toda su vida.

Por el contrario, los resultados de la presente tesis muestran que los individuos longevos sí que sufren los efectos del envejecimiento sobre el funcionamiento del sistema inmunitario y los parámetros de estrés oxidativo e inflamatorio (aunque en menor medida que aquellos que no logran alcanzar edades tan avanzadas) pero que son capaces de activar mecanismos compensatorios en edades avanzadas, aumentando la maquinaria de defensa antioxidante y la liberación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, lo que les permite mantener una funcionalidad inmunitaria óptima a esas edades (Artículo 5).

Tradicionalmente, los individuos que logran alcanzar una elevada longevidad han sido considerados como excepciones al proceso de envejecimiento. Sin embargo, podría ser que éstos constituyeran la norma del envejecimiento saludable y que las excepciones fueran el resto de individuos que no logran adaptarse a los cambios propios del proceso de envejecimiento facilitando la aparición de enfermedades asociadas a la edad, y consecuentemente, no logran alcanzar edades tan longevas. Recientemente, se ha propuesto que la “homeostasis adaptativa”, entendida como la capacidad de adaptación y remodelación del individuo ante distintos estreses, se deteriora a partir del último tercio de la vida, siendo este el motivo del colapso final de la funcionalidad del individuo ([Pomatto y Davies, 2017](#); [Pomatto, 2019](#)). En este sentido, los resultados de la presente tesis parecen demostrar que los individuos que consiguen alcanzar una elevada longevidad mantienen esa “homeostasis adaptativa” durante el último tercio de la vida. Así, por un lado, se observó que los centenarios (Artículo 2) presentaban una “firma redox” diferenciada del resto de grupos de distintas edades. Esta firma redox se caracterizaba por

presentar bajos niveles de compuestos oxidantes y elevados niveles de defensas antioxidantes, siendo estas superiores a las observadas en adultos. Por lo indicado, y de acuerdo con el concepto de homeostasis adaptativa, el mantenimiento de la homeostasis a estas edades requeriría de una elevada capacidad antioxidante. Por otro lado, el hecho de que estos individuos longevos presenten una elevada liberación de citoquinas pro-inflamatorias tanto en condiciones basales como tras estimulación (Artículo 3), nos lleva a pensar que estas citoquinas tienen que ser fundamentales en esta adaptación homeostática en estas edades extremas. De acuerdo con esta idea de adaptación y remodelación, se demostró también que los individuos longevos tienen una dinámica de proliferación distinta a la observada en otras edades. Así, se observó que esos individuos presentaban una respuesta proliferativa más temprana que la que tiene lugar en la edad adulta (Artículo 3), lo cual indicaría una capacidad más rápida de respuesta frente a los antígenos, lo que podría representar una ventaja adaptativa en estas edades.

Respecto a los mecanismos que permiten alcanzar una elevada longevidad en estos individuos, se propone a la proteína Hsp70. Así, se observó (Artículo 4) que la concentración de Hsp70 en ratones longevos, independientemente del tipo de tejido estudiado, es similar a la observada en adultos. En el contexto que nos atañe, las células inmunitarias, los ratones longevos mostraron una elevada concentración de esta proteína, similar a la observada en los leucocitos procedentes de ratones adultos. Así, estas cantidades más altas de Hsp70 ayudarían a mantener el factor de transcripción NF- κ B reprimido, como ha sido observado en estas células procedentes de individuos longevos ([Arranz et al. 2010a](#)), siendo un mecanismo clave en la prevención de la inflamación crónica asociada a la edad. De acuerdo con esta idea, se demostró (Artículo 3) que los leucocitos peritoneales de ratones longevos presentaban una liberación elevada de IL-10 y controlada de TNF- α en reposo con valores similares a los que presentaban cuando eran adultos. Por tanto, el cociente IL-10/TNF- α se propone como marcador de longevidad.

- Parámetros predictores de esperanza de vida y longevidad en ratones:

Los resultados comentados hasta ahora sugieren que lo que puede ser un mecanismo adaptativo y beneficioso en edades extremas, puede no serlo a otras edades y viceversa. Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que el significado de un valor alto o bajo en un parámetro concreto (ya sea de función inmunitaria, estrés oxidativo o inflamatorio), no tiene por qué ser el mismo a todas las edades. De acuerdo con esta idea, se ha descrito que el tener un índice alto de masa corporal en edades adultas es predictor de la aparición de diversas enfermedades

asociadas al proceso de envejecimiento, así como de mortalidad (Flegal et al. 2013). Por el contrario, el presentar un índice alto de masa corporal en edades muy avanzadas es predictor de longevidad (Auyeung y Lee, 2010). Siguiendo esta idea, con los resultados recogidos en el Artículo 5 se ha podido comprobar que el papel predictor de longevidad de los parámetros de funcionalidad inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio no es el mismo a todas las edades. De este modo, se observó que una serie de parámetros presentaban un antagonismo pleiotrópico inverso, de manera que altos valores en la edad adulta se asociaban con una mortalidad temprana mientras que esos mismos valores en edades avanzadas se asociaban con una elevada longevidad. Este fue el caso de los parámetros: actividad citotóxica NK, actividades de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión reductasa y de la liberación basal de IL-6 e IL-1 β .

El hecho de que una actividad NK antitumoral muy elevada en la edad adulta se asocie con una menor longevidad podría ser debido a que tal aumento es consecuencia de una incrementada aparición de procesos cancerígenos, y que esa mayor actividad sólo refleje el intento del organismo por controlarlos. También, podría suceder que una elevada actividad citotóxica aumentase el daño tisular mediante la liberación de compuestos oxidantes y pro-inflamatorios, contribuyendo a acelerar la velocidad de envejecimiento. Por otro lado, el hecho de tener una actividad citotóxica NK elevada en edades muy avanzadas podría resultar adaptativo, dada la acumulación de células dañadas potencialmente cancerígenas. Siguiendo un razonamiento similar, el tener elevadas las defensas antioxidantes, como la catalasa o la glutatión reductasa en la edad adulta, podría, por un lado, ser el resultado de una elevada generación de ROS en el organismo, las cuales acelerarían la velocidad de envejecimiento. Por otro lado, esta elevada actividad antioxidante sería capaz de interferir con los fundamentales procesos de señalización en los que las ROS participan. En edades avanzadas esta elevada actividad antioxidante constituiría un mecanismo adaptativo muy beneficioso para contrarrestar el aumento de ROS asociado a la edad. De acuerdo con esta idea, un estudio relativamente reciente ha demostrado que la sobreexpresión de catalasa mitocondrial en ratones jóvenes es perjudicial, mientras que su sobreexpresión en ratones viejos tenía un efecto positivo (Basisty et al. 2016). La explicación que dan estos autores a dicha observación, es que la sobreexpresión de la catalasa mitocondrial en ratones jóvenes podría afectar a las vías de señalización redox necesarias para el correcto funcionamiento celular y sugieren que esto explicaría también el hecho de que mecanismos antioxidantes más fuertes no hayan sido seleccionados evolutivamente en animales jóvenes en la naturaleza. Por último, una elevada liberación basal de citoquinas pro-inflamatorias desde la edad adulta contribuiría a aumentar el estrés inflamatorio acelerando la velocidad de envejecimiento, mientras que la liberación de las

mismas en edades avanzadas podría ser necesario para mantener una adecuada funcionalidad inmunitaria. De hecho, recientemente se ha demostrado que la IL-6 juega un papel esencial al ser liberada por células senescentes como mediadora de la reprogramación del resto de células ([Chiche et al. 2017](#)).

Una vez comprobado que los parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio pueden resultar buenos marcadores de la velocidad de envejecimiento, nos preguntamos cuáles de ellos resultan ser más robustos para predecir la esperanza de vida. Por ello nos planteamos construir una serie de modelos matemáticos predictivos de longevidad en ratones basados en los valores que se tuviese, en la edad adulta, en parámetros de función inmunitaria, por otro, en parámetros de estrés oxidativo y, en tercer lugar, en parámetros conductuales. Así se demostró que (Artículo 6), dentro de los parámetros de función inmunitaria, aquellos que resultan más robustos a la hora de predecir la longevidad son la capacidad quimiotáctica y fagocítica de macrófagos y la capacidad proliferativa de linfocitos. En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo, los que guardaban más relación con la esperanza de vida fueron la concentración de glutatión reducido (GSH) y de malondialdehído (MDA) y la actividad antioxidante glutatión peroxidasa (GPx). Y en cuanto a las respuestas conductuales, las mejores en la predicción de longevidad son aquellas que se asociaban con bajos niveles de ansiedad, como la distancia recorrida en la zona interna del tablero de agujeros y el tiempo que está el animal en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado. También se desarrolló un cuarto modelo, incluyendo los parámetros seleccionados de función inmunitaria y estrés oxidativo. Cuando estos modelos fueron validados en un nuevo lote de ratones, se demostró que los que presentaban mayor reproducibilidad eran el Modelo Inmunitario y el Modelo Combinado. Estos resultados, por tanto, ensalzan el uso de los parámetros de función inmunitaria como predictivos de longevidad, por encima de los parámetros de estrés oxidativo y de los conductuales. No obstante, y en función de los resultados observados en la presente tesis, se hace necesario desarrollar modelos predictivos de longevidad para otros grupos de edad, hecho que será objeto de futuras investigaciones. Del mismo modo, dado que el papel predictivo de longevidad de estos parámetros en la presente tesis ha sido investigado únicamente en ratones hembra, la relación existente entre estos parámetros y la longevidad también debe investigarse en ratones macho, dadas las diferencias sexuales que hay no sólo en la esperanza de vida (mayor en las hembras), también en la inmunidad (más potente en hembras) y el estado oxidativo e inflamatorio (mayor en machos), entre otros aspectos ([Fischinger et al. 2018](#)). Dadas estas diferencias, sería plausible que los marcadores que predicen la longevidad en ratones hembra puedan ser diferentes a los de los ratones macho.

Por otro lado, uno de los criterios más utilizados en humanos para predecir morbilidad y mortalidad es la cuantificación de la fragilidad. Si bien el envejecimiento y la fragilidad son conceptos que están estrechamente relacionados, no necesariamente son coincidentes. A pesar de que ambos procesos tienen como base la pérdida del mantenimiento de la homeostasis al envejecer, se ha propuesto que mientras que en el envejecimiento el fallo homeodinámico es global, en la fragilidad, éste giraría en torno a los cambios neuromusculares (Fedarko et al. 2011). Así, con el fin de profundizar en la relación existente entre envejecimiento y fragilidad, se utilizaron una serie de criterios de fragilidad que se emplean en el ser humano y que han sido adaptados a ratones (Gómez-Cabrera et al. 2017), para la cuantificación de la fragilidad en ratones de distintas edades, así como en ratones adultos envejecidos prematuramente (PAM) y se investigó su relación con la longevidad. Se demostró (Artículo 7) que los parámetros de fragilidad en ratones a las edades investigadas, adulta, madura y vieja, estaban relacionados con la esperanza de vida de los mismos. Sin embargo, se pudo comprobar que la inadecuada respuesta al estrés, criterio que ha sido usado por nuestro laboratorio durante muchos años para seleccionar a aquellos animales que presentan un envejecimiento prematuro (PAM) (Viveros et al. 2001; Guayerbas et al. 2002a; 2002b; 2002c; Puerto et al. 2002; Guayerbas et al. 2005; Alvarado et al. 2006a; Alvarado et al. 2006b; Viveros et al. 2007; De la Fuente y Giménez-Llort, 2010; Vida et al. 2014), guardaba más relación con la esperanza de vida de los ratones que la clasificación en base a los criterios de fragilidad, ya que los PAM clasificados como robustos vivieron menos que los R-NPAM robustos. Por tanto, estos resultados sugieren que la velocidad de envejecimiento tiene un papel dominante sobre el estado de fragilidad en cuanto a la predicción de longevidad.

- Parámetros indicadores, en humanos, de envejecimiento acelerado, patológico y de supervivencia en el caso de los centenarios:

Por otra parte, dado que se demostró que los parámetros de función inmunitaria y estrés oxidativo experimentaban la misma dinámica de cambios con la edad en humanos y en ratones (Artículo 1 y 2), quisimos validar dichos parámetros como marcadores de la velocidad de envejecimiento en humanos. Como se ha observado en la presente tesis, el hecho de tener una inadecuada respuesta al estrés en ratones, se asocia con una peor funcionalidad inmunitaria, mayores niveles de estrés oxidativo y una menor longevidad (Artículo 1 y 2). Del mismo modo, en mujeres de mediana edad, como se recoge en el Artículo 8, se pudo demostrar que cuanto mayor es el grado de estrés percibido, peor resulta la funcionalidad de sus

leucocitos, mayor es el estrés oxidativo e inflamatorio y mayor es la edad biológica de estas mujeres. Estos resultados remarcan la importancia de la comunicación entre los tres sistemas homeostáticos, el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, y explicaría por qué las situaciones de depresión, estrés emocional o la ansiedad se asocian con una mayor susceptibilidad a infecciones, cánceres o enfermedades autoinmunes ([Arranz et al. 2007](#); [Arranz et al. 2009a](#); [2009b](#); [Costa-Pinto y Palermo-Neto, 2010](#); [Cruces et al. 2014](#)).

Por otra parte, y aunque el envejecimiento en sí no es una enfermedad, sí que supone el principal factor de riesgo para muchas enfermedades. Una de las más relacionadas con el proceso de envejecimiento es la enfermedad de Alzheimer (EA), la patología neurodegenerativa y causa de demencia senil más frecuente. En este sentido, se ha descrito que el aumento del estrés oxidativo juega un papel fundamental tanto en la etiología como en la patogénesis de la EA ([Nunomura et al. 2001](#); [Zhu et al. 2007](#); [Persson et al. 2014](#); [Huang et al. 2016](#); [Butterfield y Halliwell, 2019](#)). Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que los pacientes con EA, presentaban una inmunidad deteriorada y mayores niveles de estrés oxidativo en comparación con controles sanos de la misma edad ([Vida et al. 2018](#)). Dado que el principal problema asociado a la EA es que la misma se diagnostica en fases muy avanzadas de la enfermedad, cuando el cerebro ya está irreversiblemente dañado, se hace primordial la identificación de marcadores prodrómicos de esta patología. Por todo ello, se abordó el estudio recogido en el Artículo 9 comprobándose que los pacientes con EA presentaban, en general, menores actividades antioxidantes y mayores niveles de estrés oxidativo en células de sangre periférica que los individuos sanos de su misma edad. Además, los individuos con Deterioro Cognitivo Leve (la cual es considerada una posible fase de transición o prodrómica a la EA), ya presentan algunos de los parámetros redox alterados en comparación con sujetos sanos de la misma edad, entre ellos las actividades GPx y GR y el daño peroxidativo a lípidos. De este modo se pueden sugerir tales parámetros como potenciales marcadores prodrómicos de la enfermedad. Además, se encontró que otros marcadores de estado redox, como la actividad GR, las concentraciones de GSH y GSSG y el cociente GSSG/GSH están asociados con el grado de deterioro cognitivo, por lo que estos datos resaltan la importancia y el impacto del estado redox periférico y los sistemas homeostáticos durante el deterioro cognitivo temprano que conduce a la demencia. No obstante, se requiere de futuras investigaciones con un abordaje longitudinal para dilucidar la relación existente entre estos marcadores y la progresión de la enfermedad.

Ante el papel tan relevante que los parámetros de función inmunitaria y de estado redox tienen en la salud de un individuo y en su longevidad, como se ha ido demostrando con los resultados recogidos en los Artículos 1, 2, 3, 5 y 6, y teniendo en cuenta que los individuos que

alcanzan una elevada esperanza de vida parecen poseer mecanismos de homeostasis adaptativa relevantes, se quiso comprobar si algunos de esos parámetros tendría un papel predictor de supervivencia en humanos centenarios que se encuentran en una situación comprometida como lo es un ingreso hospitalario. Así, con los resultados del Artículo 10 se demostró que, efectivamente, una serie de parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio son predictores de supervivencia y mortalidad en esa población de centenarios cuando ingresan en el hospital. Estos resultados son de gran relevancia ya que los parámetros investigados resultaron ser mejores predictores de supervivencia que los de tipo bioquímico que son habitualmente analizados en el ámbito clínico. De hecho, se ha demostrado que los índices metabólicos tradicionales como la glucosa, los triglicéridos, el colesterol y los niveles de creatinina son muy limitados como marcadores pronóstico en centenarios ([Baggio et al. 1998](#); [Szewieczek et al. 2015](#)). Además, dado que se predice un aumento significativo del número de centenarios en los próximos años, existe una necesidad urgente de identificar mejores marcadores pronóstico en este grupo de individuos. Así, los resultados de la presente tesis proporcionan unos valores de corte para marcadores tales como la adherencia de los neutrófilos, la quimiotaxis y la actividad microbicida, la actividad NK, la linfoproliferación estimulada por PHA, la liberación basal de IL-6, TNF- α y IL-10; la liberación en respuesta a PHA de IL-1 β e IL-6, la actividad GR y la concentración de anión superóxido y MDA, los cuales tienen potencial para ser utilizados en el ámbito clínico como predictores de supervivencia en centenarios. Sin embargo, dado que los datos fueron analizados retrospectivamente, se necesitan futuros estudios prospectivos para validar estos marcadores utilizando una población más grande de centenarios.

- Discusión global:

En conjunto, todos los resultados de la presente tesis permiten concluir que el estado redox e inflamatorio de las células inmunitarias, así como la capacidad funcional de las mismas resultan ser marcadores de la velocidad a la que está envejeciendo cada individuo y, consecuentemente, pueden ser utilizados para predecir tanto una longevidad saludable como un envejecimiento prematuro o patológico.

Pero, además, dada la especial contribución de las células inmunitarias en el aumento del estrés oxidativo e inflamatorio, que son los últimos responsables del daño asociado al proceso de envejecimiento, este papel de marcador no es pasivo, sino activo, ya que su actividad va a modular la velocidad de envejecimiento. Este hecho, el que el funcionamiento del sistema

inmunitario sea capaz de modular la velocidad de envejecimiento, abre múltiples vías de intervención para ralentizar el inevitable proceso de envejecimiento. En este sentido, se ha demostrado que varias estrategias de estilo de vida, como la administración de cantidades apropiadas de antioxidantes en la dieta, el ejercicio físico, la actividad física y mental mediante el enriquecimiento ambiental y el ambiente social adecuado, mejoran las funciones de las células inmunitarias, disminuyen su estrés oxidativo y, en consecuencia, aumentan la longevidad de los individuos ([De La Fuente et al. 2011](#); [De la Fuente, 2018a](#); [Garrido et al. 2018](#); [2019](#)). Además, dadas las recientes investigaciones que demuestran que la microbiota y la comunicación intestino-cerebro pueden jugar un papel fundamental en el funcionamiento del sistema inmunitario ([Xia et al. 2019](#)), la modulación de la microbiota mediante el uso de probióticos y prebióticos podría ser otra prometedora estrategia para controlar la velocidad de envejecimiento ([Hunsche et al. 2018](#)).

A pesar de las respuestas generadas en la presente tesis respecto a varios aspectos del envejecimiento, aún son muchas más las cuestiones que quedan por responder. Por tanto, se requiere de futuras investigaciones dirigidas a descifrar los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento, ya que la identificación de los mismos, nos proporcionarían elementos diana sobre los que incidir más directamente para poder ralentizarlo. Del mismo modo, son necesarios más trabajos centrados en el estudio de la maquinaria celular y molecular que permite que ciertos individuos alcancen una elevada longevidad sin padecer la mayoría de enfermedades asociadas al avance de la edad. Todo ello permitirá en un futuro ayudar a conseguir un envejecimiento saludable.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, como respuesta a los objetivos planteados, en la presente tesis se deducen las siguientes conclusiones:

1. Los parámetros de función inmunitaria como la capacidad de migración y de ingestión de fagocitos, la capacidad de migración de linfocitos, la actividad citotóxica Natural Killer y la capacidad proliferativa de linfocitos se deterioran a medida que avanza la edad tanto en humanos como en ratones. Sin embargo, los individuos longevos muestran una funcionalidad adecuada de sus células inmunitarias, mientras que aquellos ratones que presentan en la edad adulta valores propios de animales cronológicamente viejos, tienen una menor longevidad. Por tanto, estos parámetros se proponen como marcadores de edad biológica.
2. Las defensas antioxidantes como la actividad catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, así como la cantidad de glutatión reducido disminuyen al envejecer, mientras que los oxidantes como el anión superóxido, el glutatión oxidado y los peróxidos de lípidos, aumentan tanto en sangre periférica en humanos como en leucocitos peritoneales de ratón. En cambio, los sujetos que alcanzan una elevada longevidad muestran un adecuado balance redox, mientras que aquellos ratones que tienen en la edad adulta bajas defensas antioxidantes y elevados compuestos oxidantes presentan una menor esperanza de vida. Por este motivo, se proponen los parámetros analizados como marcadores de la velocidad de envejecimiento.
3. La linfoproliferación y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en ausencia de estimulación aumenta con la edad, mientras que la liberación de citoquinas anti-inflamatorias disminuye. Sin embargo, al envejecer, en respuesta a un estímulo se deterioran todas esas funciones. Por otro lado, los ratones longevos presentan una respuesta proliferativa de sus linfocitos más temprana que los ratones de otras edades. Además, se caracterizan por presentar un cociente IL-10/TNF- α superior a los ratones viejos y similar al observado en adultos. En virtud de ello, el cociente IL-10/TNF- α se propone como marcador de longevidad.

4. La concentración basal de la chaperona Hsp70 experimenta cambios con la edad de forma diferencial en tejidos compuestos por células mitóticas y post-mitóticas. En ambos tipos de tejido, los ratones longevos muestran concentraciones similares a las observadas en ratones adultos y aquellos animales que en la edad adulta presentan una concentración similar a la observada en viejos, tienen una menor longevidad. Por ello, se propone a esta chaperona como un posible marcador de velocidad de envejecimiento.
5. El papel predictor de longevidad de la mayoría de los parámetros de función inmunitaria, estrés oxidativo e inflamatorio investigados depende de la edad del individuo en que se hayan analizados. De este modo, parámetros como la capacidad proliferativa y de migración de linfocitos, la migración y fagocitosis de macrófagos, la actividad antioxidante glutatión peroxidasa, la concentración de glutatión reducido y de peróxidos de lípidos, así como la liberación basal de IL-6, TNF- α e IL-1 β correlacionan fuertemente con la esperanza de vida de cada ratón en la edad adulta. Sin embargo, parámetros como la actividad citotóxica Natural Killer, la actividad catalasa y la glutatión reductasa, así como la liberación basal de IL-6 e IL-1 β son predictores de mortalidad en edades avanzadas. En consecuencia, los primeros pueden ser usados como marcadores de velocidad de envejecimiento mientras que los segundos para discriminar qué individuos alcanzarán una elevada longevidad.
6. La capacidad quimiotáctica y fagocítica de macrófagos y la proliferativa de linfocitos resultan ser las funciones inmunitarias más robustas, en la edad adulta, para predecir la esperanza de vida de un ratón. En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo, los que guardan más relación con la longevidad son la concentración de glutatión reducido, de peróxidos de lípidos y la actividad antioxidante glutatión peroxidasa. Respecto a los parámetros conductuales, lo son la locomoción en la zona interna del tablero de agujeros y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado. Los modelos matemáticos de predicción de longevidad construidos en base a estos parámetros muestran una gran reproducibilidad al ser aplicados a un nuevo lote de ratones, aunque los modelos que incluyen parámetros de función inmunitaria son los más robustos.

7. El índice de fragilidad cuantificado mediante el "Test Valencia" en ratones, puede ser útil para predecir la esperanza de vida de los animales en la edad adulta, madura y vieja.
8. El grado de estrés percibido en mujeres de mediana edad, independientemente del tipo de estrés, tiene un profundo impacto en el estrés oxidativo e inflamatorio, y en la capacidad funcional de las células inmunitarias, de modo que cuanto mayor es ese estrés percibido, mayor es el oxidativo e inflamatorio y peor la función inmunológica. Además, los altos niveles de estrés percibido parecen estar asociados con un envejecimiento acelerado y, en consecuencia, con una mayor edad biológica.
9. Los pacientes con Enfermedad de Alzheimer presentan menor actividad glutatión peroxidasa y reductasa, concentración de glutatión reducido y mayor actividad catalasa y malondialdehído en células de sangre periférica con respecto a los controles de la misma edad. Además, algunos de estos marcadores ya están alterados en pacientes con deterioro cognitivo leve (como las actividades glutatión peroxidasa y reductasa y la concentración de malondialdehído) y, por lo tanto, podrían usarse como marcadores prodrómicos, para el diagnóstico temprano, de la Enfermedad de Alzheimer.
10. Una serie de parámetros de función y de estado redox de las células inmunitarias podrían ser utilizados en el entorno clínico como predictores de supervivencia en los centenarios ante un ingreso hospitalario. Es el caso de la capacidad de adherencia, quimiotaxis y actividad microbicida de neutrófilos, la actividad citotóxica Natural Killer, la respuesta proliferativa de linfocitos, la liberación basal de IL-6, TNF- α y IL-10 y la estimulada de IL-1 β e IL-6, así como la actividad glutatión reductasa y las concentraciones de anión superóxido intracelular y de peróxidos de lípidos. Otros parámetros como la quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos podrían ser usados como indicadores de recuperación en estos individuos.

7. CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the results obtained in this thesis:

1. The immune function parameters such as the chemotaxis and phagocytic capacity of phagocytes, the chemotaxis of lymphocytes, the cytotoxic Natural Killer activity as well as the proliferative capacity of lymphocytes undergo an age-related decline both in humans and mice. Nevertheless, long-lived individuals display an adequate function of their immune cells, whereas adult mice that show similar values to those observed in old mice, have a shorter life span. Hence, these parameters are postulated as markers of biological age.
2. The antioxidant defences (catalase, glutathione peroxidase and reductase activities as well as reduced glutathione content) experience an age-related decrease, whereas oxidant compounds (superoxide anion, oxidized glutathione, peroxidative damage to lipids) undergo an age-related increase. However, long-lived individuals have an adequate redox balance, whereas those mice that at the adult age display low antioxidant defences and high oxidant compounds, have a shorter longevity. Therefore, the investigated parameters are proposed as markers of the rate of aging.
3. The lymphoproliferative capacity and the release of pro-inflammatory cytokines in basal conditions increase with age, whereas the release of anti-inflammatory cytokines decreases. Nevertheless, in response to a stimulus, there is an age-related impairment in all these responses. Moreover, long-lived mice have an earlier lymphoproliferative response than mice from other ages and show a higher IL-10/TNF- α ratio than old mice being similar to that in adult mice. Hence, the IL-10/TNF- α ratio is postulated as a marker of longevity.
4. The concentration of Hsp70 varies with age, depending on the mitotic or post-mitotic composition of the tissue analysed. In all tissues, long-lived mice have similar Hsp70 concentrations to those observed in adult mice, whereas those adult mice showing similar levels to those found in old mice, have a shorter life span. Therefore, the basal concentration of Hsp70 is postulated as a marker of the rate of aging.

5. The predictive role towards longevity of most of the immune function, oxidative and inflammatory stress parameters investigated depends on the age of the individual. Thus, some parameters such as the chemotaxis and proliferative capacity of lymphocytes, the chemotaxis and phagocytosis of macrophages, the glutathione peroxidase activity, the concentrations of reduced glutathione and lipid peroxidative damage as well as the basal release of IL-6, TNF- α and IL-1 β , strongly correlate with life span at the adult age. However, other parameters such as the cytotoxic Natural Killer activity, catalase and glutathione reductase activities as well as the basal release of IL-6 and IL-1 β correlate with life span at advanced ages. Consequently, the former parameters can be used as markers of the rate of aging, whereas the latter could be used to identify which individuals will reach a high longevity.
6. The chemotaxis and phagocytic capacity of macrophages as well as the lymphoproliferative response of lymphocytes seem to be the most robust immune functions for predicting life span at the adult age. With respect to the redox parameters, those with a strongest relationship with life span are the concentration of reduced glutathione and peroxidative damage to lipids as well as the activity of glutathione peroxidase. Among the behavioural indices, the internal locomotion in the hole-board and the time spent in open arms in the elevated plus-maze are the strongest predictors of life span. The mathematical models constructed with the above-mentioned parameters, as predictive of longevity, display a high reproducibility when applied to a new set of mice, but those including immune function parameters are the most robust.
7. The frailty index quantified by the “Valencia Score” in mice can be used to predict life span at the adult, mature and old ages.
8. The self-reported perceived stress, independently of the type, intensity and duration of the stressor, has a profound impact on the function of immune cells as well as on the oxidative and inflammatory state of the individual. Thus, the higher the degree of perceived stress in middle-aged women, the higher the oxidative and inflammatory state and the worse the immune function. Moreover, high perceived stress levels seem to be associated with an accelerated aging and therefore, with a higher biological age.

9. Individuals with Alzheimer's Disease display lower glutathione peroxidase and reductase activities, reduced glutathione concentration as well as higher catalase activity and lipid peroxidative damage in peripheral blood with respect to age-matched controls. Furthermore, some of these markers are already altered in individuals with Mild Cognitive Impairment, such as the glutathione peroxidase and reductase activities and the peroxidative damage to lipids, and therefore, have the potential to be used as prodromal markers of Alzheimer's Disease.

10. A series of immune function, oxidative and inflammatory stress parameters could be used in the clinical setting as predictors of survival in centenarians under hospital admission. This is the case for the adherence, chemotaxis and microbicide activity of neutrophils, the cytotoxic Natural Killer activity, the proliferative capacity of lymphocytes, the basal release of IL-6, TNF- α and IL-10, the stimulated release of IL-1 β and IL-6, the glutathione reductase activity and the concentration of superoxide anion and lipid peroxidative damage. Other parameters, such as the chemotaxis of neutrophils and lymphocytes could be used as indicators of recovery in these individuals.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abe T, Tohgi H, Isobe C, Murata T, Sato C. (2002). Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 70(3):447-50.
- Abe Y, Hashimoto Y, Tomita Y, Terashita K, Aiso S, Tajima H, Niikura T, Matsuoka M, Nishimoto I. (2004). Cytotoxic mechanisms by M239V presenilin 2, a little-analyzed Alzheimer's disease-causative mutant. *J Neurosci Res.* 77(4):583-95.
- Abraham EC, Taylor JF, Lang CA. (1978). Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. *Biochem Jour.* 174(3):819-825.
- Adams L, Franco MC, Estevez AG. (2015). Reactive nitrogen species and cellular signaling. *Exp Biol Med.* 240(6): 711-7.
- Ademokun A, Wu YC, Dunn-Walters D. (2010). The ageing B cell population: composition and function. *Biogerontology.* 11(2):125-37.
- Adolfsson O, Huber BT, Meydani SN. (2001). Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naïve but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity. *J Immunol.* 167:3809-3817.
- Afilalo J. (2011). Frailty in Patients with Cardiovascular Disease: Why, When, and How to Measure. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* 5 (5): 467-472.
- Afshar H, Roohafza HR, Keshteli AH, Mazaheri M, Feizi A, Adibi P. (2015). The association of personality traits and coping styles according to stress level. *J Res Med Sci.* 20(4):353–358.
- Agarwal S, Busse PJ. (2010). Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 104(3):183-90.
- Ahluwalia N, Mastro AM, Ball R, Miles MP, Rajendra R, Handte G. (2001). Cytokine production by stimulated mononuclear cells did not change with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech Ageing Dev.* 122: 1269-79.
- Ahn SG, Thiele DJ. (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17:516–528.
- Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D. (2006). Age dependent modifications of type 1 and type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. *Mech Ageing Dev.* 127: 560–6.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Innate Immunity. In: *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). The Adaptive Immune System. In: *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science.

- Albright JW, Bream JH, Bere EW, Young HA, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. (2004). Aging of innate immunity: functional comparisons of NK/LAK cells obtained from bulk cultures of young and aged mouse spleen cells in high concentrations of interleukin-2. *Exp Gerontol.* 39:73-82.
- Allman D, Miller JP. (2005). B cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol.* 17: 463-7.
- Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. (2011). Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol.* 72: 319-29.
- Alonso-Fernández P, De la Fuente M. (2011). Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci.* 4: 78-100.
- Alonso-Fernández P, Maté I, De la Fuente M. (2010). Neutrophils in biological age and longevity. New York: Nova Science Publishers, pp. 41-5.
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M. (2008). Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatr Soc.* 56:2244-51.
- Alonso-Fernández P. (2006). Estudio del perfil inmunológico en individuos centenarios. Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez L, De la Fuente M. (2006b). Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. *Dev Comp Immunol.* 30: 1168-80.
- Alvarado C, Álvarez P, Puerto M, Gausserès N, Jiménez L, De la Fuente M. (2006a). Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition.* 22: 767-77.
- Ambra R, Mocchegiani E, Giacconi R, Canali R, Rinna A, Malavolta M, Virgili F. (2004). Characterization of the hsp70 response in lymphoblasts from aged and centenarian subjects and differential effects of in vitro zinc supplementation. *Exp Gerontol.* 39: 1475–1484.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:7915-22.
- Amieva H, Le Goff M, Millet X, Orgogozo JM, Pérès K, Barberger-Gateau P, Jacqmin-Gadda H, Dartigues JF. (2008). Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms. *Ann Neurol.* 64:492-8.

- Andersen HR, Jeune B, Nybo H, Nielsen JB, Andersen-Ranberg K, Grandjean P. (1998). Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians. *Age Ageing*. 27:643–648.
- Anson RM, Bohr VA. (2000). Mitochondria, oxidative damage, and aging. *J Amer Aging Assoc*. 23: 199-218.
- Antoch MP, Wrobel M, Kuropatwinski KK, Gitlin I, Leonova KI, Toshkov I, Gleiberman AS, Hutson AD, Chernova OB, Gudkov AV. (2017). Physiological frailty index (PFI): quantitative in-life estimate of individual biological age in mice. *Aging*. 9:615–626.
- Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. (2014). Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol*. 34(4):301-14.
- Aranda R, Doménech E, Diana Rus A, Real JT, Sastre J, Viña J, Pallardó FV. (2007). Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Rad Res*. 41(11):1195-1200.
- Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. (2010a). Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappa β . *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 65:941-50.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, De la Fuente M. (2010c). Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Res*. 13: 415-28.
- Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. (2009b). Impairment of immune function in the social excluded homeless population. *Neuroimmunomodulation*. 16: 251-60.
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. (2008). The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med*. 45:1252-62.
- Arranz L, Giménez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. (2009a). El aislamiento social durante la vejez empeora el deterioro cognitivo, conductual e inmunitario asociado a la edad. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 44:137-142.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. (2007). Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res*. 62: 1-8.
- Arranz L, Lord JM, De la Fuente M. (2010b). Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice. *Age*. 32:451-466.
- Arranz L, Naudí A, De la Fuente M, Pamplona R. (2013) Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age*. 35(3):621-35.

- Auyeung T, Lee J. (2010). Survival in older men may benefit from being slightly overweight and centrally obese—a 5-year follow-up study in 4,000 older adults using DXA. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 65(1):99–104.
- Avila-Funes JA, Helmer C, Amieva H, Barberger-Gateau P, Le Goff M, Ritchie K, Portet F, Carrière I, Tavernier B, Gutiérrez-Robledo LM, Dartigues JF. (2008). Frailty among community dwelling elderly people in France: the three-city study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 63:1089–1096.
- Aw D, Silva AB, Palmer DB (2007) Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*. 120: 435-446.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014:360438.
- Aybek H, Ercan F, Aslan D, Sahiner T. (2007). Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin Biochem*. 40:172–6.
- Bae CY, Kang YG, Kim S, Cho C, Kang HC, Yu BY, Lee SW, Cho KH, Lee DC, Lee K, Kim JS, Shin KK. (2008). Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters. *Arch Gerontol Geriatr*. 47:253–65.
- Barak Y. (2006). The immune system and happiness. *Autoimmun Rev*. 5: 523-27.
- Barbagallo M, Marotta F, Dominguez LJ. (2015). Oxidative stress in patients with Alzheimer's Disease: effect of extracts of fermented papaya powder. *Mediators Inflamm*. 2015:624801.
- Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, Grella R, Ragno E, Carbonella M, Abbatecola AM, Paolisso G. (2003). Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol*. 38: 137-43.
- Barja G. (2002). Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Rad Biol Med*. 33: 1167-72.
- Barja G. (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 27(10):595-600.
- Barja G. (2013). Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects and confounding concepts. *Antiox Redox Signal*. 19:1420–1445.
- Barja G. (2019). Towards a unified mechanistic theory of aging. *Exp Gerontol*. 124:110627.
- Bartsch H, Nair J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage and repair. *Langenbecks Arch Surg*. 391:499-510.

- Basisty N, Dai DF, Gagnidze A, Gitari L, Fredrickson J, Maina Y, Beyer RP, Emond MJ, Hsieh EJ, MacCoss MJ, Martin GM, Rabinovitch PS. (2016). Mitochondrial-targeted catalase is good for the old mouse proteome, but not for the young: “reverse” antagonistic pleiotropy? *Aging Cell*. 15(4):634-645.
- Bauer M, De la Fuente M. (2016). The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 158:27–37.
- Bauer ME. (2005). Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*. 8: 69-83.
- Bauer ME. (2008). Chronic stress and immunosenescence: a review. *Neuroimmunomodulation*. 15(4-6): 241-50.
- Beach SR, Schulz R, Yee JL, Jackson S. (2000). Negative and positive health effects of caring for a disabled spouse: longitudinal findings from the caregiver health effects study. *Psychol Aging*. 15:259-271.
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. (2001). Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence. En: Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press, pp. 241-86.
- Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, Harrington H, Israel S, Levine ME, Schaefer JD, Sugden K, Williams B, Yashin AI, Poulton R, Moffit TE. (2015). Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:E4104–10.
- Benfante R, Reed D, Brody J. (1985). Biological and social predictors of health in an aging cohort. *J Chronic Dis*. 38:385–95.
- Bergman H, Ferrucci L, Guralnik J, Hogan DB, Hummel S, Karunanathan S, Wolfson C. (2007). Frailty: an emerging research and clinical paradigm--issues and controversies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 62: 731-7.
- Bermejo P, Martín-Aragón S, Benedí J, Susín C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. (2008). Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer’s disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res*. 42:162-170.
- Berry CE, Hare JM. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 555(3):589-606.
- Besedovsky HO, Del Rey A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrin Rev*. 17: 64-102
- Besedovsky HO, Del Rey A. (2007). Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun*. 21: 34-44.

- Besedovsky HO, Del Rey A. (2011). Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res.* 36: 1-6.
- Biasi D, Carletto A, Dell'Agnola C, Caramaschi P, Montesanti F, Zavateri G, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM. (1996). Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. *Inflammation.* 20(6): 673-681.
- Blalock JE. (1984). The immune system as a sensory organ. *J Immunol.* 132: 1067-70.
- Blom JW, de Ruijter W, Witteman JC, Assendelft WJ, Breteler MM, Hofman A, Gussekloo J. (2011). Changing prediction of mortality by systolic blood pressure with increasing age: the Rotterdam study. *Age.* 35(2):431-438.
- Bloom GS. (2014). Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 71(4):505-8.
- Bonafè M, Barbi C, Storci G, Salvioli S, Capri M, Olivieri F, Valensin S, Monti D, Gonos ES, De Benedictis G, Franceschi C. (2002). What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians. *Exp Gerontol.* 37: 1263-71.
- Bonelli M, Desenzani S, Cavallini G, Donati A, Romani A, Bergamini E, Borghetti A. (2008). Low-level caloric restriction rescues proteasome activity and Hsc70 level in liver of aged rats. *Biogerontology.* 9:1–10.
- Borghi C, Dormi A, L'Italien G, Lapuerta P, Franklin SS, Collatina S, Gaddi A. (2003). The relationship between systolic blood pressure and cardiovascular risk – results of the Brisighella Heart Study. *J Clin Hypertens.* 5(1):47–52.
- Borrás C, Abdelaziz KM, Gambini J, Serna E, Inglés M, de la Fuente M, Garcia I, Matheu A, Sanchís P, Belenguer A, Errigo A, Avellana JA, Barettino A, Lloret-Fernández C, Flames N, Pes G, Rodríguez-Mañas L, Viña J. (2016). Human exceptional longevity: transcriptome from centenarians is distinct from septuagenarians and reveals a role of Bcl-xL in successful aging. *Aging.* 8(12):3185-3208.
- Borrás C, Serna E, Gambini J, Inglés M, Vina J. (2017). Centenarians maintain miRNA biogenesis pathway while it is impaired in octogenarians. *Mech Ageing Dev.* 168:54-57.
- Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. (2013). Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol.* 25: 511-5.
- Boyman O, Sprent J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 12(3):180-90.
- Breen AP, Murphy JA. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 18(6): 1033-77.

- Brieger K, Schiavonea S, Miller FJ, Krausea KH. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 142:13659.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochem Biophys Acta.* 1830(5): 3289-303.
- Brigelius-Flohé R, Traber MG. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13(10):1145-55.
- Broome CS, Kayani AC, Palomero J, Dillmann WH, Mestril R, Jackson MJ, McArdle A. (2006). Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. *FASEB J.* 20:1549–1551.
- Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg Jv, Pedersen BK, Jeune B. (2003a). Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med.* 115: 278-83.
- Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. (1999). A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 54A: M357–64.
- Bruunsgaard H, Ladelund S, Pedersen AN, Schroll M, Jørgensen T, Pedersen BK. (2003b). Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin Exp Immunol.* 132:24–31.
- Bruunsgaard H, Pederson M, Pederson BK. (2001). Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol.* 8:131–136.
- Buford TW, Willoughby DS. (2008). Impact of DHEA(S) and cortisol on immune function in aging: a brief review. *Appl Physiol Nutr Metab.* 33(3):429-33.
- Bulpitt CJ, Antikainen RL, Markowe HL, Shipley MJ. (2009). Mortality according to a prior assessment of biological age. *Curr Aging Sci.* 2:193–99.
- Butcher SK, Killampalli V, Lascelles D, Wang K, Alpar EK, Lord JM. (2005). Raised cortisol:DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity. *Aging Cell.* 4:319-24.
- Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med.* 7:548-54.
- Butterfield DA, Halliwell B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 20(3):148-160.
- Butterfield DA. (1997). Beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem Res Toxicol.* 10:495-506.

- Cai JG, Luo LM, Tang H, Zhou L. (2018). Cytotoxicity of Malondialdehyde and Cytoprotective Effects of Taurine via Oxidative Stress and PGC-1 α Signal Pathway in C2C12 Cells. *Mol Biol.* 52(4): 616-627.
- Calabrese V, Cornelius C, Cuzzocrea S, Lavicoli I, Rizzarelli E, Calabrese EJ. (2011). Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Asp Med.* 32:279–304.
- Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT, Iavicoli I, Di Paola R, Koverech A, Cuzzocrea S, Rizzarelli E, Calabrese EJ. (2012). Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis.* 1822:753–783.
- Calderwood SK, Murshid A, Prince T. (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging – a mini-review. *Gerontology.* 55:550–558.
- Camous X, Pera A, Solana R, Larbi A. (2012). NK cells in healthy and age-associated diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 195956.
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. (2011). Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics.* 74(11):2313-23.
- Carlo MD, Loeser RF. (2003). Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheumatol.* 48(12):3419-3430.
- Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C. (2004). Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1028: 1-13.
- Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res.* 33:450–8.
- Cawthon PM, Marshall LM, Michael Y, Dam TT, Ensrud KE, Barrett-Connor E, Orwoll ES. (2007). Frailty in older men: prevalence, progression, and relationship with mortality. *J Am Geriatr Soc.* 55:1216–1223.
- Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P, Liguri G. (2002). Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med.* 15:1372–9.
- Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59(3):527-605.
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med.* 39:841-52.

- Chiche A, Le Roux I, von Joest M, Sakai H, Aguín SB, Cazin C, Salam R, Fiette L, Alegria O, Flamant P, Tajbakhsh S, Li H. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell*. 20(3):407-414.
- Chiste RC, Freitas M, Mercadante AZ, Fernandes E. (2015). Superoxide anion radical: generation and detection in celular and non-celular systems. *Curr Med Chem*. 22(37): 4234-56.
- Christen Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 71:621S-9S.
- Chung H, Song S, Kim H, Ikeno Y, Yu B. (1999). Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation. *J Nutr Health Aging*. 3:19-23.
- Cohen S, Kamarch T, Mermelstein R. (1983). A global measure of perceived stress. *J Health Soc Behav*. 24:385-96.
- Cohen S, Kessler RC, Gordon LU. (1997). *Measuring stress: A guide for health and social scientists*. NewYork. Oxford University Press.
- Cohen S, Miller GE, Rabin BS. (2001). Psychological stress and antibody response to immunization: A critical review of the human literature. *Psychosom Med*. 63: 7–18.
- Collin F, Cheignon C, Hureau C. (2018). Oxidative stress as a biomarker for Alzheimer's disease. *Biomark Med*.12(3):201-203.
- Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. (2002). Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol*. 37: 205-11.
- Colotti C, Cavallini G, Vitale RL, Donati A, Maltinti M, Del Ry S, Bergamini E, Giannessi D. (2005). Effects of aging and anti-aging caloric restrictions on carbonyl and heat shock protein levels and expression. *Biogerontology*. 6:397–406.
- Comfort A. (1969). Test-battery to measure ageing-rate in man. *Lancet*. 1969; 2:1411–14.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261:921-3.
- Corey-Bloom J. (2002). The ABC of Alzheimer's disease: cognitive changes and their management in Alzheimer's disease and related dementias. *Int Psychogeriatr*. 14(1):51-75.
- Cornelius C, Perrotta R, Graziano A, Calabrese EJ, Calabrese V. (2013). Stress responses, vitagenes and hormesis as critical determinants in aging and longevity: mitochondria as a “chi”. *Immun Ageing*. 10:15.

-
- Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. (1997). Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry*. 27: 297-313.
 - Costa-Pinto FA, Palermo-Neto J. (2010). Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation*. 17(3):196-9.
 - Couto N, Wood J, Barber J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Rad Biol Med*. 95: 27-42.
 - Coyle JT, Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 262:689-95.
 - Crawley J. (2000). What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 - Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames B, Saul RL, McCord JM, Harman D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Inter Med*. 107(4):526-45.
 - Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. (2014). The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr Pharm Des*. 20(29):4608-28.
 - Csaba G. (2014). Hormones in the immune system and their possible role. A critical review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 61(3):241-60.
 - Cutler RG. (2005). Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. *Rejuvenation Res*. 8:138-140.
 - Dagvadorj J, Naiki Y, Tumurkhuu G, Hassan F, Islam S, Koide N, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. (2008). Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through reduced MyD88 expression. *Innate Immun*. 14(2):109-15.
 - Dantzer R. (2001). Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci*. 933: 222-34.
 - Day BJ. (2009). Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochem Pharmacol*. 77:285-96.
 - Daynes RA, Enioutina EY, Jones DC. (2003). Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence. *Antioxid Redox Signal*. 5: 537-48.
 - De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Tresguerres JA. (2004a). Changes with aging in several leukocyte functions of male and female rats. *Biogerontology*. 5:389-400.

- De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. (2011). Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des.* 17(36):3966-93.
- De la Fuente M, Giménez-Llort L. (2010). Models of aging of neuroimmunomodulation: strategies for its improvement. *Neuroimmunomodulation.* 17(3): 213-6.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Alvarez P, Alvarado C. (2004b). Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence. *Cell Mol Biol.* 50:683-90.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Víctor VM, Arnalich F. (2008b). Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res.* 42:272-280.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. (2005). The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antiox Redox Signal.* 7:1356-1366.
- De la Fuente M, Miquel J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of aging. The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des.* 15(26): 3003-26.
- De la Fuente M. (2008a). Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation.* 15:213-223.
- De la Fuente M. (2014). The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. En: Massoud A, Rezaei N, Eds. *Immunology of Aging.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 3-23.
- De la Fuente M. (2018a). Oxidation and Inflammation in the immune and nervous systems, a link between aging and anxiety. In *Handbook of Immunosenescence.* T. Fulops et al., (eds.). Springer Nature. 28 pp.
- De la Fuente M. (2018b). Desarrollo de la respuesta del sistema inmunitario. En: *Fisiología Humana.* J.A.F. Tresguerres (ed.). 5 edición. Cap. 25. McGraw Hill. Mexico.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. (2005). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* 579: 2035-9.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. (2006). Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol.* 80(3):219-27.
- De Martinis M, Modesti M, Loreto MF, Quaglini D, Ginaldi L. (2000). Adhesion molecules on peripheral blood lymphocyte subpopulations in the elderly. *Life Sci.* 68:139-151.

- Del Rey A, Besedovsky HO. (2018). The Immune System as a Sensor Able to Affect Other Homeostatic Systems (Chapter 5). In: Immunopsychiatry: A Clinician's Introduction to the Immune Basis of Mental Disorders. Publisher: Oxford University Press.
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. (2006). Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*. 7: 471-81.
- Dellu F, Mayo W, Vallée M, Le Moal M, Simon H. (1994). Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. *Brain Res*. 653: 51-6.
- Demand J, Alberti S, Patterson C, Höhfeld J. (2011). Cooperation of an ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol*. 11 (20): 1569-1577
- Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. (2009). Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol*. 21: 440-5.
- Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R. (2010). Leukocyte function in the aging immune system. *J Leuk Biol*. 87:1001-1009.
- Dhabhar FS. (2009). Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 16(5): 300–317.
- Dice JF. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 3 (4): 295-299
- Dimitrijević M, Aleksić I, Vujić V, Stanojević S, Pilipović I, von Hörsten S, Laposavić G. (2014). Peritoneal exudate cells from long-lived rats exhibit increased IL-10/IL-1 β expression ratio and preserved NO/urea ratio following LPS-stimulation in vitro. *Age*. 36(4):9696.
- Dozmorov IM, Dresser D. (2010). Immune System as a Sensory System. *Int J Biomed Sci*. 6(3):167–175.
- Drew BG, Ribas V, Le JA, Henstridge DC, Phun J, Zhou Z, Soleymani T, Daraei P, Sitz D, Vergnes L, Wanagat J, Reue K, Febbraio MA, Hevener AL. (2014). HSP72 is a mitochondrial stress sensor critical for parkin action, oxidative metabolism, and insulin sensitivity in skeletal muscle. *Diabetes*. 63:1488–1505.
- Dröge W, Breitkreutz R. (2000). Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc*. 59(4):595-600.

- Dröge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmünder H. (1994). Function of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 8:1131-1138.
- Dröge W. (2005). Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Phil Trans R Soc B.* 360:2355-2372.
- Duda RO, Hart PE, Stork DG. (2001). *Pattern Classification*. Vol. 2nd ed. John Wiley and Sons; New York.
- Effros RB, Pawelec G. (1997). Replicative senescence of T cells: Does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today.* 18:450–454.
- Ellard DR, Castle PC, Mian R. The effect of a short-term mental stressor on neutrophil activation. *Int J Psychophysiol.* 2001 May;41(1):93-100.
- Enns LC, Wiley JC, Ladiges WC. (2008). Clinical relevance of transgenic mouse models for aging research. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 18:81-91.
- Ensrud KE, Ewing SK, Cawthon PM, Fink HA, Taylor BC, Cauley JA, Dam TT, Marshall LM, Orwoll ES, Cummings SR. (2009). A comparison of frailty indexes for the prediction of falls, disability, fractures, and mortality in older men. *J Am Geriatr Soc.* 57:492–498.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17312-5.
- Esparza B, Sánchez H, Ruíz M, Barranquero M, Sabino E, Merino F. (1996). Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry. *Immunol Invest.* 25(3): 185-190.
- Espinosa-Oliva AM, de Pablos RM, Villaran RF, Arguelles S, Venero JL, Machado A, Cano J. (2011). Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging.* 32:85–102.
- Esterbauer H, Zollner H, Schaur J. (1990). Aldehydes formed by lipid peroxidation: Mechanisms of formation, occurrence, and determination, in *Membrane Lipid Oxidation*. Ed. C. Vigo-Pelfrey. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 239–268.
- Fabris N. (1990). A neuroendocrine-immune theory of aging. *Int J Neurosci.* 51: 373-5.
- Fabris N. (1991). Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr.* 12:219-30.
- Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. (1993). Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol.* 23: 2375-8.

- Fahlström A, Zeberg H, Ulfhake B. (2012). Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction. *Age*. 34(6):1435-52.
- Farrall AJ, Wardlaw JM. (2009). Blood-brain barrier: ageing and microvascular diseases systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging*. 30:337–52.
- Fedarko NS. (2011). The biology of aging and frailty. *Clin Geriatr Med*. 27(1):27–37.
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. (1995). Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non-survivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 50: B378-82.
- Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. (2017). Hsp70-a master regulator in protein degradation. *FEBS Lett*. 591(17):2648-2660.
- Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. (2005). The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. 105: 2294-9.
- Ferrucci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy RP, Corti MC, Cohen HJ, Penninx B, Pahor M, Wallace R, Havlik RJ. (1999). Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc*. 47: 639–646.
- Finch CE, Morgan TE, Longo VD, de Magalhaes JP. (2010). Cell resilience in species life spans: a link to inflammation? *Aging Cell*. 9: 519–526.
- Fischinger S, Boudreau CM, Butler AL, Streeck H, Alter G. (2018). Sex differences in vaccine-induced humoral immunity. *Semin Immunopathol*. 41(2):239–249.
- Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. (2013). Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 309(1):71–82.
- Fonager J, Beedholm R, Clark BFC, Rattan SIS. (2002). Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp Gerontol*. 37:1223–1228.
- Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, Pletcher MA, Smith AE, Tang K, Yuan CW, Brown JC, Friedman J, He J, Heuton KR, Holmberg M, Patel DJ, Reidy P, Carter A, Cercy K, Chapin A, Douwes-Schultz D, Frank T, Goettsch F, Liu PY, Nandakumar V, Reitsma MB, Reuter V, Sadat N, Sorensen RJD, Srinivasan V, Updike RL, York H, Lopez AD, Lozano R, Lim SS, Mokdad AH, Vollset SE, Murray CJL. (2018). Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet*. 392(10159):2052-2090.

- Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johansson B, Nilsson BO, Wikby A. (2003). Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev.* 124: 487-93.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. (2000a). Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908:244-54.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S. (2000b). Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine.* 18: 1717-20.
- Franceschi C, Bonafè M. (2003). Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans.* 31: 457-61.
- Franceschi C, Campisi J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69:4-9.
- Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. (2007a). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 128:92-105.
- Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, Conte M, Santoro A, Grignolio A, Monti D, Capri M, Salvioli S. (2018). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med.* 5:61.
- Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab.* 28(3):199-212.
- Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Salvioli S, Grassilli E, Capri M, Troiano L, Guido M, Bonafè M, Tropea F, Salomoni P, Benatti F, Bellesia E, Macchioni S, Anderlini R, Sansoni P, Mariotti S, Wratten ML, Tetta C, Cossarizza A. (1996). Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. *Nephrol Dial Transplant.* 11: 18-25.
- Franceschi C, Monti D, Cossarizza A, Fagnoni F, Passeri G and Sansoni P. (1991). Aging, longevity and cancer: studies in Down's syndrome and in centenarians. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1991; 621, 428-440.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today.* 16: 12-6.
- Franceschi C, Salvioli S, Garagnani P, de Eguileor M, Monti D, Capri M. (2017). Immunobiography and the Heterogeneity of Immune Responses in the Elderly: A Focus on Inflammaging and Trained Immunity. *Front Immunol.* 8:982.

- Franceschi C. (2007b). Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev.* 65: S173-6.
- Frasca D, Nguyen D, Riley RL, Blomberg BB. (2003). Effects of aging on proliferation and E47 transcription factor activity induced by different stimuli in murine splenic B cells. *Mech Ageing Dev.* 124: 361–369.
- Freeman BA, Grapo JD. (1982). Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47: 412-26.
- Fridovich I. (1997). Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272:18515-17.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 56 (3): M146-56.
- Fulop T, Dupuis G, Baehl S, Le Page A, Bourgade K, Frost E, Witkowski JM, Pawelec G, Larbi A, Cunnane S. (2016). From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology.* 17(1):147-57.
- Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. (2004). Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell.* 3:217-226.
- Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, Witkowski JM, Franceschi C. (2018). Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol.* 8:1960.
- Fulop T, Larbi A, Pawelec G. (2013). Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol.* 4:1–9.
- Fulop T, Witkowski JM, Pawelec G, Alan C, Larbi A. (2014). On the immunological theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol.* 39:163-76.
- Galioto A, Dominguez LJ, Pineo A, Ferlisi A, Putignano E, Belvedere M, Costanza G, Barbagallo M. (2008). Cardiovascular risk factors in centenarians. *Exp Gerontol.* 43: 106-13.
- Garcia-Garcia FJ, Larrion Zugasti JL, Rodríguez-Mañas L. (2011). Frailty: a phenotype under review. *Gac Sanit.* 25:51-8.
- Garrido A, Cruces J, Ceprián N, Corpas I, Tresguerres JA, De la Fuente M. (2019). Social environment improves immune function and redox state in several organs from prematurely aging female mice and increases their lifespan. *Biogerontology.* 20(1):49-69.

- Garrido A, Cruces J, Ceprián N, De la Fuente M. (2018). Improvements in Behavior and Immune Function and Increased Life Span of Old Mice Cohabiting With Adult Animals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 73(7):873-881.
- Gaweda-Walerych K, Zekanowski C. (2013). Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance - relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neurobiol Exp*. 73:199–224.
- Gebicki S, Gebicki JM. (1993). Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem J*. 289:743-49.
- Gehrig SM, van der Poel C, Sayer TA, Schertzer JD, Henstridge DC, Church JE, Lamont S, Russell AP, Davies KE, Febbraio MA, Lynch GS. (2012). Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature*. 484:394–398.
- Gerli R, Monti D, Bistoni O, Mazzone AM, Peri G, Cossarizza A, Di Gioacchino M, Cesarotti ME, Doni A, Mantovani A, Franceschi C, Paganelli R. (2000). Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech Ageing Dev*. 121: 37-46.
- Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res*. 40(5): 495-505.
- Gilca M, Lixandru D, Gaman L, Vîrgolici B, Atanasiu V, Stoian I. (2014). Erythrocyte membrane stability to hydrogen peroxide is decreased in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 28:358-63.
- Giménez-Llort L, Maté I, Manassra R, Vida C, De la Fuente M. (2012). Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1262:74-84.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Martorelli V, Quagliano D. (1999a). The immune system in the elderly II. Specific cellular immunity. *Immunol Res*. 20:109-115.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quagliano D. (1999b). The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res*. 20: 117-26.
- Giovannini S, Onder G, Liperoti R, Russo A, Carter C, Capoluongo E, Pahor M, Bernabei R, Landi F. (2011). Interleukin-6, C-reactive protein, and tumor necrosis factor-alpha as predictors of mortality in frail, community-living elderly individuals. *J Am Geriatr Soc*. 59(9):1679-85.
- Giuliani N, Sansoni P, Girasole G, Vescovini R, Passeri G, Passeri M, Pedrazzoni M. (2001). Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. *Exp Gerontol*. 36: 547-57.

- Giulivi C, Boveris A, Cadenas E. (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys.* 316: 909-16.
- Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J. (2008). Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 5: 51.
- Glass GA, Gershon D. (1984). Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem J.* 218(2):531-537.
- Globerson A, Effros RB. (2000). Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today.* 21: 515-21.
- Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, de Lima Umeoka EH. (2018). A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci.* 12:127.
- Goldman N, Gleit DA, Seplaki C, Liu IW, Weinstein M. (2005). Perceived stress and physiological dysregulation in older adults. *Stress.* 8:95-105.
- Gomez-Cabrera MC, Garcia-Valles R, Rodriguez-Mañas L, Garcia-Garcia FJ, Olaso-Gonzalez G, Salvador-Pascual A, Tarazona-Santabalbina FJ, Viña J. (2017). A new frailty score for experimental animals based on the clinical phenotype: inactivity as a model of frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 72:885–891.
- González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica.* 25(1):3-9.
- Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3(1):23–35.
- Gougerot-Pocidalo MA, Fay M, Roche Y, Chollet-Martin S. (1988). Mechanisms by which oxidative injury inhibits the proliferative response of human lymphocytes to PHA. Effect of the thiol compound 2-mercaptoethanol. *Immunology.* 64 (2):281-8.
- Goyns MH. (2002). Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev.* 123:791-9.
- Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksnadel K, Leblhuber F, Fuchs D, Oettl K. (2008). Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res.* 42:633–8.
- Grignolio A, Mishto M, Faria AM, Garagnani P, Franceschi C, Tieri P. (2014). Towards a liquid self: how time, geography, and life experiences reshape the biological identity. *Front Immunol.* 5:153.

- Guayerbas N, Catalán M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. (2002a). Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence. *Behav Brain Res.* 134(1-2): 41-8.
- Guayerbas N, De la Fuente M. (2003). An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Dev Comp Immunol.* 27:339-350.
- Guayerbas N, Puerto M, Fernández MD, De la Fuente M. (2002b). A diet supplemented with thiolic antioxidants improves leucocyte function in two strains of prematurely aging mice. *Clin Exp Pharmacol.* 29: 1009-14.
- Guayerbas N, Puerto M, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. (2005). Thiolic antioxidant supplementation of the diet reverses age-related behavioural dysfunction in prematurely ageing mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 80(1): 45-51.
- Guayerbas N, Puerto M, Víctor VM, Miquel J, De la Fuente M. (2002c). Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence. *Exp Gerontol.* 37:249-256.
- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.* 37:1932–1937.
- Guzhova IV, Darieva ZA, Melo AR, Margulis BA. (1997). Major stress protein Hsp70 interacts with NF-kB regulatory complex in human T-lymphoma cells. *Cell Stress Chaperones.* 2:132–139.
- Haber F, Weiss J. (1934). The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London.* 147:332-351.
- Hajishengallis G. (2010). Too Old to Fight? Aging and its Toll on Innate Immunity. *Mol Oral Microbiol.* 25: 25–37.
- Hall DM, Sattler GL, Sattler CA, Zhang HJ, Oberley LW, Pitot HC, Kregel KC. (2001). Aging lowers steady-state antioxidant enzyme and stress protein expression in primary hepatocytes. *J Gerontol Ser A Biol Med Sci.* 56: 259–B267.
- Hallgren HM, Bergh N, Rodysill KJ, O’Leary JJ. (1998). Lymphocyte proliferative response to PHA and anti-CD3/Ti monoclonal antibodies T cell surface marker expression, and serum IL-2 receptor levels as biomarkers of age and health. *Mech Aging Dev.* 43:175–85.
- Halliwell B, Auroma OI. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281:9-19.
- Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59: 1609-23.

- Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease. *Nutr Rev.* 55: S44-S52.
- Halliwell B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for our health? *Cardiovasc Res.* 73:341-47.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. (1990). Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature.* 345:458-60.
- Harman D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11:298-300.
- Harman D. (1972). The biological clock. The mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20:99-117.
- Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. (1999). Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med.* 106: 506–512.
- Harrison R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 6(33):774-96.
- Hayflick L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 37:614-36.
- Hazeldine J, Lord JM. (2013). The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev.* 12(4):1069–1078.
- Henry JP, Wang S. (1998). Effects of early stress on adult affiliative behaviors. *Psychoneuroendocrinology.* 23: 863-75.
- Henstridge DC, Bruce CR, Drew BG, Tory K, Kolonics A, Estevez E, Chung J, Watson N, Gardner T, Lee-Young RS, Connor T, Watt MJ, Carpenter K, Hargreaves M, McGee SL, Hevener AL, Febbraio MA. (2014). Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes.* 63:1881–1894.
- Herbert TB, Cohen S. (1993). Stress and immunity in humans: A meta-analytic review. *Psychosom Med.* 55:364–79.
- Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vázquez JJ, Arnalich F. (2000). Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci.* 67:1317-1324.
- Herrero C, Sebastián C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Celada A. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Exp Gerontol.* 37: 389-94.

- Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. (1992). Aging and immunity. *Acta Pathol Jpn.* 42:537-48.
- Hirokawa K. (1998). Immunity and aging. In: Pathy MSJ editor. *Principles and Practice of Geriatric Medicine* London: John Wiley and Sons Ltd, 1998. p. 35–47.
- Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Lavoie JP. (2012). Neutrophils Are Not Less Sensitive Than Other Blood Leukocytes to the Genomic Effects of Glucocorticoids. *PLoS One.* 7:44606.
- Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, Kehm R, König J, Grune T, Castro JP. (2017). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* 11:482-501.
- Homma T, Fujii J. (2015). Application of glutathione as anti-oxidative and anti-aging drugs. *Curr Drug Metab.* 16(7): 560-71.
- Horvath S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14:R115.
- Hsiung GYR, Sadovnick AD, Felman H. (2004). Apolipoprotein E4 genotype as a risk factor for cognitive decline and dementia: data from the Canadian study of health and aging. *CMAJ.* 171(8): 863-7.
- Huang HC, Jiang ZF. (2009). Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 16(1):15-27.
- Huang MC, Greig NH, Luo W, Tweedie D, Schwartz JB, Longo DL, Ferrucci L, Ershler WB, Goetzl EJ. (2011). Preferential enhancement of older human T cell cytokine generation, chemotaxis, proliferation and survival by lenalidomide. *Clin Immunol.* 138: 201-11.
- Huang WJ, Zhang X, Chen WW. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep.* 4(5):519–522.
- Hunsche C, Cruces J, Garrido A, Hernández O, De La Fuente M. (2018). Dietary Supplementation with Fermented Milk Containing Probiotics Improves Behaviour and Immune Response of Aged Mice. *J Prob Health.* 6(1): 201
- Huppert FA, Solomou W, O'Connor S, Morgan K, Sussams P, Brayne C. (1998). Aging and lymphocyte subpopulations: whole-blood analysis of immune markers in a large population sample of healthy elderly individuals. *Exp Gerontol.* 33: 593-600.
- Ibanez CF. (2004). Lipid rafts as organizing platforms for cell chemotaxis and axon guidance. *Neuron.* 42:3–5.
- Ihara Y, Hayabara T, Sasaki K, Kawada R, Nakashima Y, Kuroda S. (2000). Relationship between oxidative stress and apoE phenotype in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 102:346-349.

- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta*. 305(1-2):75-80.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. (2010). Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies. *Alzheimers Dement*. 6(5):420–424.
- Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H. (2003). Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 311:1014-1018.
- Irie M, Asami S, Nagata S, Miyata M, Kasai H. (2001). Relationships between perceived workload, stress and oxidative DNA damage. *Int Arch Occup Environ Health*. 74:153–157.
- Izgüt-Uysal VN, Ağaç A, Karadoğan İ, Dedin N. (2003). Effects of L-carnitine on neutrophil functions in aged rats. *Mech Ageing Dev*. 124(3): 341-347.
- Jeandel C, Nicolas MB, Dubois F, Nabet-Belleville F, Penin F, Cuny G. (1989). Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 35:275-82.
- Jiménez-Jiménez FJ, de Bustos F, Molina JA, Benito-León J, Tallón-Barranco A, Gasalla T, OrtíPareja M, Guillamón F, Rubio JC, Arenas J, Enríquez-de-Salamanca R. (1997). Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease. *J Neural Transmis*. 104(6-7):703-10.
- Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. (2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*. 33:1290-300.
- Jové M, Naudí A, Gambini J, Borrás C, Cabré R, Portero-Otín M, Viña J, Pamplona R. (2017). A stress-resistant lipidomic signature confers extreme longevity to humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 72:30–37.
- Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. (2004). Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 25:5-16.
- Kabelitz D, Janssen O. (1997). Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front Biosci*. 2:61-77.
- Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Karakaya AE. (2004). Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*. 9(2):203-9.
- Kand'ar R. (2016). The ratio of oxidized and reduced forms of selected antioxidants as a possible marker of oxidative stress in humans. *Biomed Chromatogr*. 30(1): 13-28.
- Kane AE, Hilmer SN, Mach J, Mitchell SJ, de Cabo R, Howlett SE. (2016). Animal models of frailty: current applications in clinical research. *Clin Interv Aging*. 11:1519–1529.

- Kasai Z, Nishimura A. (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucl Acids Res.* 12:2137-45.
- Kassed CA, Herkenham M. (2004). NF- κ B p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety. *Behav Brain Res.* 154: 577–584.
- Keresztes M, Rudisch T, Tajti J, Ocsovszki I, Gardi J. Granulocyte activation in humans is modulated by psychological stress and relaxation. *Stress.* 2007 Aug;10(3):271-81.
- Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 3:73-80.
- Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R. (1984). Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med.* 46: 7-14.
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J. (1996). Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 3043–7.
- Kim BY, Han MJ, Chung AS. (2001). Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic Biol Med.* 30: 686-698.
- Kirkwood TB. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell.* 120(4):437-47.
- Kłapcińska B, Derejczyk J, Wieczorowska-Tobis K, Sobczak A, Sadowska-Krepa E, Danch A. (2000). Antioxidant defense in centenarians (a preliminary study). *Acta Biochim Pol.* 47:281–292.
- Konieczny J, Arranz L. (2018). Updates on Old and Weary Haematopoiesis. *Int J Mol Sci.* 19(9):2567.
- Kovalenko EI, Boyko AA, Semenov VF, Lutsenko GV, Grechikhina MV, Kanevskiy LM, Azhikina TL, Telford WG, Sapozhnikov AM. (2014). ROS production, intracellular HSP70 levels and their relationship in human neutrophils: effects of age. *Oncotarget.* 5(23):11800-12.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.* 39(5):687-99.
- Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas-Wright H, Miles MP, Ahluwalia N. (1999). Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech Ageing Dev.* 112: 43-57.
- Kristensen TS. (1996). Job stress and cardiovascular disease; a theoretic critical review. *J Occup Health Psychol.* 1:246–260

- Kumar R, Joshi G, Kler H, Kalra S, Kaur M, Arya R. (2018). Toward an understanding of structural insights of xanthine and aldehyde oxidases: an overview of their inhibitors and role in various diseases. *Med Res Rev.* 38(4): 1073-125.
- LaRock CN, Todd J, LaRock DL, Olson J, O'Donoghue AJ, Robertson AA, Cooper MA, Hoffman HM, Nizet V. (2016). IL-1 β is an innate immune sensor of microbial proteolysis. *Sci Immunol.* 1(2): eaah3539.
- Larosa V, Remacle C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep.* 10. Pii: BSR20171492.
- Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. (2010). Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell.* 9: 527-35.
- Lee EH. (2012). Review of the psychometric evidence of the perceived stress scale. *Asian Nurs Res.* 6:121-7.
- Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. (2000). The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60(14):3927-39.
- Linnane AW, Baumer A, Maxwell R J, Preston H, Zhang CF, Marzuki S. (1990). Mitochondrial gene mutation: the ageing process and degenerative diseases. *Biochem Int.* 22:1067-76.
- Linton PJ, Dorshkind K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 5: 133-9.
- Liu H, Graber TG, Ferguson-Stegall L, Thompson LV. (2014). Clinically relevant frailty index for mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69:1485–1491.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. (2004). Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann NY Acad Sci.* 1019:346-9.
- Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N, Davis TP. (2011). Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30:1625-36.
- Lord JM, Akbar AN, Kipling D. (2002). Telomere-based therapy for immunosenescence. *Trends Immunol.* 23:175-176.
- Lord JM, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, Salmon M. (2001). Neutrophil ageing and immunesenescence. *Mech Ageing Dev.* 122(14): 1521-1535.
- Lu SC. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830(5): 3143-53.

- Luca M, Luca A, Calandra C. (2015). The Role of Oxidative Damage in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Oxid Med Cell Longev*. 2015: 504678.
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol*. 30:366-73.
- Machado A, Herrera AJ, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Ayala A, Venero JL, Santiago M, Villarán RF, Delgado-Cortés MJ, Argüelles S, Cano J. (2014). Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 25(6):785-804.
- Madden KS, Sanders VM, Felten DL. (1995). Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 35: 417-48.
- Madden KS. (2003). Catecholamines, sympathetic innervation and immunity. *Brain Behav Immun*. 17: 5-10.
- Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, Kenis G, Bosmans E, De Meester I, Benoy I, Neels H, Demedts P, Janca A, Scharpe S, Smith RS. (1998). The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*. 10:313– 8.
- Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A. (2001). Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriatr*. 32: 1-14.
- Mangialasche F, Kivipelto M, Mecocci P, Rizzuto D, Palmer K, Winblad B, Fratiglioni L. (2010). High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *J Alzheimer's Dis*. 20(4):1029-37.
- Marchetti B, Morale MC, Testa N, Tirolo C, Caniglia A, Amor S, Dijkstra CD, Barden N. (2001). Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA. *Brain Res Rev*. 37: 259-72.
- Marcourakis T, Camarini R, Kawamoto EK, Rodrigue-Scorsi L, Scavone C. (2008). Peripheral biomarkers of oxidative stress in aging and Alzheimer's disease. *Dement Neuropsychol*. 2:2-8.
- Marrack P, Scott-Browne J, MacLeod MK. (2010). Terminating the immune response. *Immunol Rev*. 236:5-10
- Martín-Aragón S, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. (2009). Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 34:373–8.
- Martínez de Toda I, De la Fuente M. (2015). The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology*. 16(6):709-21.

- Maté I, Cruces J, Giménez-Llort L, De la Fuente M. (2015). Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 43(1): 213-26.
- Maté I. (2015). Caracterización de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en el envejecimiento humano y en un modelo de Alzheimer en ratón. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32:595-603.
- McAndrew J, Patel RP, Jo H, Cornwell T, Lincoln T, Moellering D, White CR, Matalon S, Darley-Usmar V. (1997). The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. *Semin Perinatol.* 21(5):351-66.
- McCray PB, Gibson DD, Fong KL, Hornbrook KR. (1976). Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 431:459-68.
- McEwen BS. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging.* 23(5):921-39.
- Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. (2000). Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med.* 28: 1243-8.
- Medvedev ZA. (1990). An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev.* 65:375-98.
- Meites J, Goya R, Takahashi S. (1987). Why the endocrine system is important in aging processes, a review. *Exp Gerontol.* 22:1-15.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 17:235-48.
- Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppedè F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G. (2005). Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging.* 26:567-73.
- Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, Morabito N, Lasco A, Gangemi S, Basile G. (2016). Inflammaging and anti-inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity. *Arch Immunol Ther Exp.* 64: 111-126.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Jhonson JE. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 15:575-91.

- Miquel J. (1998). An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol.* 33:113-26.
- Mitnitski AB, Mogilner AJ, MacKnight C, Rockwood K. (2002). The mortality rate as a function of accumulated deficits in a frailty index. *Mech Ageing Dev.* 123:1457–1460.
- Miyaji C, Watanabe H, Toma H, Akisaka M, Tomiyama K, Sato Y, Abo T. (2000). Functional alteration of granulocytes, NK cells, and natural killer T cells in centenarians. *Hum Immunol.* 61: 908-16.
- Miyazawa M, Ishii T, Yasuda K, Noda S, Onouchi H, Hartman PS, Ishii N. (2009). The role of mitochondrial superoxide anion (O₂⁻) on physiological aging in C57BL/6J mice. *J Radiat Res.* 50(1):73-83.
- Mo JQ, Hom DG, Andersen JK. (1995). Decreases in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. *Mech Ageing Dev.* 81:73- 82.
- Mocchegiani E, Malavolta M. (2004). NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell.* 3: 177184.
- Moeller M, Hirose M, Mueller S, Roelf C, Baltrusch S, Ibrahim S, Junghanss C, Wolkenhauer O, Jaster R, Köhling R, Kunz M, Tiedge M, Schofield PN, Fuellen G. (2014). Inbred mouse strains reveal biomarkers that are pro-longevity, antilongevity or role switching. *Aging Cell.* 13(4):729-738.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-42.
- Morley JE, Kaiser FE, Perry HM, Patrick P, Morley PM, Stauber PM, Vellas B, Baumgartner RN, Garry PJ. (1997). Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism.* 46:410-3.
- Moroni F, Di Paolo ML, Rigo A, Cipriano C, Giacconi R, Recchioni R, Marcheselli F, Malavolta M, Mocchegiani E. (2005). Interrelationship among neutrophil efficiency, inflammation, antioxidant activity and zinc pool in very old age. *Biogerontology* 6: 271-81.
- Mosmann TR, Sad S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 17(3):138-46.
- Nakamura E, Miyao K. (2007). A method for identifying biomarkers of aging and constructing an index of biological age in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 62:1096–105.
- Nardai G, Csermely P, Söti C. (2002). Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis. *Exp Gerontol.* 37:1257–1262.

- Naudí A, Jové M, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G, Pamplona R. (2013). Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Front Physiol.* 4:372.
- Newaz MA, Yousefipour Z, Oyekan A. (2006). Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not NAD (P) H oxidase-dependent. *J Cardiovasc Pharmacol.* 48(3): 88-94.
- Njemini R, Abeele MV, Demanet C, Lambert M, Vandebosch S, Mets T. (2002). Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Immunol.* 22:195–205.
- Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH 3rd, De S, Ejiogu N, Zhang Y, Mattison JA, Becker KG, Zonderman AB, Evans MK. (2013). Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging.* 5(10):725-40.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(8):759-67.
- Oberley LW, Oberley TD, Buettner GR. (1981). Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide. *Med Hypotheses.* 7:21–42.
- Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K. (2001). Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people. *Clin Exp Immunol.* 124:392–7.
- Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, Nomura T. (1997). Natural Killer cells in the late decades of human life. *Clin Immunol Immunopathol.* 84:269-275.
- Oishi Y, Manabe I. (2016). Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ Aging Mech Dis.* 2:16018.
- Olovnikov AM. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 41:181-90.
- OMS: Organización Mundial de la Salud, página web www.who.int, 2019.
- Ongrádi J, Kövesdi V. (2010). Factors that may impact on immunosenescence: an appraisal. *Immun Ageing.* 7: 7.
- Ozawa T. (1995). Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exper Gerontol.* 30:269-90.
- Ozcankaya R, Delibas N. (2002). Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J.* 43:28–32.

- Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C. (2010). Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 469(1):6-10.
- Pahlavani MA, Harris MD. (1998). Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. *Free Radic Biol Med.* 25(8):903–913.
- Pamplona R, Barja G. (2003). Aging rate, free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies. En: Van Zglinicki T (Eds.). *Biology of aging and its modulation series. Vol 1. Aging at the molecular level, new molecular level.* New York: Kluwer Academic Publishers: pp. 47-64.
- Pamplona R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta.* 1777:1249–1262.
- Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Manzella D, Gambardella A, Varricchio M. (1998). Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc.* 46: 833-8.
- Parks RJ, Fares E, Macdonald JK, Ernst MC, Sinal CJ, Rockwood K, Howlett SE. (2012). A procedure for creating a frailty index based on deficit accumulation in aging mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67:217–227.
- Paultre F, Mosca L. (2006). The relation of blood pressure to coronary heart mortality in different age groups varies by ethnicity. *Am J Hypertens.* 19(2):179–183.
- Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, Schaudt K. (1995). Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunol Today.* 16: 420-2.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. (2002a). T-cells and aging. *Front Biosci.* 7:1056-1183.
- Pawelec G, Effros C, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R. (1999). T cells and aging. *Front Bioscience.* 4:216–69.
- Pawelec G, Ouyang Q, Colonna-Romano G, Candore G, Lio D, Caruso C. (2002b). Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. *Trends Immunol.* 23: 330-2.
- Pawelec G. (2012). Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation? *Immun Ageing.* 9:15.
- Pedrero-Pérez E, de León JMRS, Lozoya-Delgado P, Rojo-Mota G, Llanero-Luque M, Puerta-García C. (2015). La Escala de Estrés Percibido (EEP): estudio psicométrico sin restricciones en población no clínica y adictos a sustancias en tratamiento. *Psicol Conductual.* 23(2):305-324.

- Pérez-Álvarez L, Baeza I, Arranz L, Marco EM, Borcel E, Guaza C, Viveros MP, De la Fuente M. (2005). Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging. *Dev Comp Immunol*. 29:965–976.
- Perna G, Iannone G, Alciati A, Caldirola D. (2015). Are Anxiety Disorders Associated with Accelerated Aging? A Focus on Neuroprogression. *Neural Plast*. 2016:8457612
- Perrin R, Briançon S, Jeandel C, Artur Y, Minn A, Penin F, Siest G. (1990). Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. *Gerontology*. 36:306-13.
- Perrotte M, Le Page A, Fournet M, Le Sayec M, Rassart É, Fulop T, Ramassamy C. (2019). Blood-based redox-signature and their association to the cognitive scores in MCI and Alzheimer's disease patients. *Free Radic Biol Med*. 130:499-511.
- Perskin MH, Cronstein BN. (1992). Age-related changes in neutrophil structure and function. *Mech Ageing Dev*. 64: 303-13.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev* 2014: 427318.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. (1999). Mild cognitive impairment; clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 56:303-308.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:8416763.
- Polidori MC, Mecocci P. (2002). Plasma susceptibility to free radical-induced antioxidant consumption and lipid peroxidation is increased in very old subjects with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 4:517–22.
- Pomatto LCD, Davies KJA. (2017). The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *J Physiol*. 595(24):7275–7309.
- Pomatto LCD, Sun PY, Davies KJA. (2019). To adapt or not to adapt: Consequences of declining Adaptive Homeostasis and Proteostasis with age. *Mech Ageing Dev*. 177:80-87.
- Ponce PD, Felipe Salech F, San Martín C, Silva M, Xiong C, Roe CM, Henriquez M, Quest AF, Behrens MI. (2014). Increased susceptibility to oxidative death of lymphocytes from Alzheimer patients correlates with dementia severity. *Curr Alzheimer Res*. 11:892-898.
- Poortvliet RK, de Ruijter W, de Craen AJ, Mooijaart SP, Westendorp RG, Assendelft WJ, Gussekloo J, Blom JW. (2013). Blood pressure trends and mortality: the Leiden 85-plus Study. *J Hypertens*. 31(1):63–70.

- Popescu BO, Toescu EC, Popescu LM, Bajenaru O, Muresanu DF, Schultzberg M, Bogdanovic N. (2009). Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *J Neurol Sci.* 283: 99–106.
- Portet F, Ousset PJ, Visser PJ, Frisoni GB, Nobili F, Scheltens P, Vellas B, Touchon J. (2006). Mild cognitive impairment (MCI) in medical practice: a critical review of the concept and new diagnostic procedure. Report of the MCI Working Group of the European Consortium on Alzheimer's Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 77(6):714-8.
- Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, Hansen LA, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Smith CD, Davis DG, Schmitt FA, Markesbery WR, Kaye J, Kurlan R, Hulette C, Kurland BF, Higdon R, Kukull W, Morris JC. (2009). Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 30: 1026-36.
- Puertas MC, Martínez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ. (2012). Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol.* 47(8):625-30.
- Puerto M, Guayerbas N, Alvarez P, De la Fuente M. (2005). Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. *J Neuroimmunol.* 165: 33-40.
- Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. (2002). Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature aging. *Pharm Biochem Behav.* 73:797-804.
- Rademakers R, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2003). Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *Sci World J.* 3:497-519.
- Ramón J. (1993). Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. IDEPSA (Internacional de Ediciones y Publicaciones, S.A.), Madrid, España.
- Rani P, Krishnan S, Rani C. (2017). Study on analysis of peripheral biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. *Front Neurol.* 8:328.
- Rattan SIS. (2018). Ageing Genes: Gerontogenes. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Raygani AV, Zahrai M, Doosti M, Javadi E, Rezaei M, Pourmoyabbed T. (2005). Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease in Tehran, Iran. *Neurosci Lett.* 375:1-6.
- Recuero M, Vicente MC, Martínez-García A, Ramos MC, Carmona-Saez P, Sastre I, Aldudo J, Vilella E, Frank A, Bullido MJ, Valdivieso F. (2009). A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: a role in Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 8:128-39.

- Remor E. (2006). Psychometric Properties of a European Spanish Version of the Perceived Stress Scale (PSS). *Span J Psychol.* 9:86-93.
- Rérole AL, Jegou G, Garrido C. (2011). Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. In: Calderwood, S.K., Prince, T.L. (Eds.), *Molecular Chaperones Methods in Molecular Biology* 787. Humana Press, pp. 205–230.
- Richter C, Park JW, Ames BN. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci.* 85:6465-67.
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 24(7):915-9.
- Rizvi SI, Maurya PK. (2007). Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Mol Biotechnol.* 37: 58-61.
- Robles Agudo F, López Arrieta JM. (2012). Fragilidad, una oportunidad para prevenir la dependencia. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 1:9-13.
- Rodríguez-Mañas L, Féart C, Mann G, Viña J, Chatterji S, Chodzko-Zajko W, Gonzalez-Colaço Harmand M, Bergman H, Carcaillon L, Nicholson C, Scuteri A, Sinclair A, Pelaez M, Van der Cammen T, Beland F, Bickenbach J, Delamarche P, Ferrucci L, Fried LP, Gutiérrez-Robledo LM, Rockwood K, Rodríguez Artalejo F, Serviddio G, Vega E. (2013). Searching for an operational definition of frailty: a Delphi method based consensus statement: the frailty operative definition-consensus conference project. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 68(1):62-7.
- Rodríguez-Martínez MA, Ruíz-Torres A. (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev.* 66(2): 213-222.
- Rossi L, Squitti R, Pasqualetti P, Marchese E, Cassetta E, Forastiere E, Rotilio G, Rossini PM, Finazzi-Agró A. (2002). Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett.* 329:137-40.
- Russell JH. (1995). Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 7:382-388.
- Ryan KA, Smith MF, Sanders MK, Ernst PB. (2004). Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappaB and interleukin-8 expression. *Infect Immun.* 72: 2123-30.
- Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. (2011). The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets.* 12:556-62.

- Salam N, Rane S, Das R, Faulkner M, Gund R, Kandpal U, Lewis V, Mattoo H, Prabhu S, Ranganathan V, Durdik J, George A, Rath S, Bal V. (2013). T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *Indian J Med Res.* 138(5):595-608.
- Salminen A, Kaarniranta K. (2010). Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF-kappaB-driven entropic aging process. *Ageing Res Rev.* 9: 298-314.
- Salminen A, Ojala J, Huuskonen J, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. (2008). Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci.* 65(7-8):1049-58.
- Salvioli S, Capri M, Valensin S, Tieri P, Monti D, Ottaviani E, Franceschi C. (2006). Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypotheses on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology. *Curr Pharm Des.* 2006;12(24):3161-71.
- Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG, Garagnani P, Giuliani C, Fontanesi E, Ostan R, Bucci L, Sevini F, Yan L, Barbieri A, Lomartire L, Borelli V, Vianello D, Bellavista E, Martucci M, Cevenini E, Pini E, Scurti M, Biondi F, Santoro A, Capri M, Franceschi C. (2013). Immune system, cell senescence, aging and longevity–inflamm-aging reappraised. *Curr Pharm Des.* 19:1675–1679.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. (1998). Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 24:699-704.
- Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Schroll M, Jeune B. (2003). High circulating levels of tumor necrosis factor-alpha in centenarians are not associated with increased production in T lymphocytes. *Gerontology.* 49: 155-60.
- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. (2008). The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol.* 43: 61-5.
- Sarkar D, Fisher PB. (2006). Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett.* 236: 13-23.
- Schieber M, Chande NS. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol.* 24(10): R453–R462.
- Schröder AK, Rink L. (2003). Neutrophil immunity of the elderly. *Mech Ageing Dev.* 124: 419-25.
- Schuessel K, Leutner S, Cairns NJ, Müller WE, Eckert A. (2004). Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *J Neural Transm.* 111:1167-82.

- Schwartz JE, Pickering TG, Landsbergis PA. (1996). Work-related stress and blood pressure: Current theoretical models and considerations from a behavioral medicine perspective. *J Occup Health Psychol.* 1(3):287–310.
- Seals DR, Justice JN, LaRocca TJ. (2015). Physiological geroscience: targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. *J Physiol.* 594(8):2001–2024.
- Segerstrom SC, Miller GE. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull.* 130: 601-30.
- Selye H. (1937). Studies on adaptation. *Endocrinology.* 21: 169-88.
- Sena LA, Chandel NS. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 48(2):158–167.
- Serna E, Gambini J, Borrás C, Abdelaziz KM, Belenguer A, Sanchis P, Avellana JA, Rodríguez-Mañas L, Viña J. (2012). Centenarians, but not octogenarians, up-regulate the expression of microRNAs. *Sci Rep.* 2:961.
- Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. (2013). Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 13(12):875-887.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. (2010). Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 22: 507-13.
- Shearer GM. (1997). Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev.* 94: 1-5.
- Shen CC, Wertelecki W, Driggers W J, LeDoux SP, Wilson GL. (1995). Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells. *Mutat Res.* 337(1):19-23.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 349(6308):431-4.
- Shimano C, Hara M, Nishida Y, Nanri H, Horita M, Yamada Y, Li YS, Kasai H, Kawai K, Higaki Y, Tanaka K. (2018). Perceived Stress, Depressive Symptoms, and Oxidative DNA Damage. *Psychosom Med.* 80:28-33.
- Shin DI, Banning U, Kim YM, Verheyen J, Hannen M, Bönig H, Körholz D. (1999). Interleukin 10 inhibits TNF-alpha production in human monocytes independently of interleukin 12 and interleukin 1 beta. *Immunol Invest.* 28(2-3):165-75.
- Sies H. (1985). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* 25:1058-71.
- Simell B, Vuorela A, Ekström N, Palmu A, Reunanen A, Meri S, Käyhty H, Väkeväinen M. (2011). Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. *Vaccine.* 29: 1929–34.

- Simioni PU, Costa EH, Tamashiro WM. (2007). Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice. *Braz J Med Biol Res.* 40(8):1111-20.
- Simons RJ, Reynolds HY. (1990). Altered immune status in the elderly. *Semin Respir Infect.* 5:251-259.
- Sinem F, Dildar K, Gökhan E, Melda B, Orhan Y, Filiz M. (2010). The serum protein and lipid oxidation marker levels in Alzheimer's disease and effects of cholinesterase inhibitors and antipsychotic drugs therapy. *Curr Alzheimer Res.* 7:463–9.
- Skoumalová A, Hort J. (2012). Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 16:2291-300.
- Sohal RS, Orr WC. (2011). The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med.* 52(3):539-555.
- Solana R, Alonso MC, Peña J. (1999). Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol.* 34: 435-43.
- Solana R, Mariani E. (2000). NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine.* 18: 1613-20.
- Solana R, Villanueva JL, Pena J, De la Fuente M. (1991). Cell mediated immunity in aging. *Comp Biochem Physiol.* 99:1– 4.
- Song C, Vandewoude M, Stevens W, De Clerck L, Van der Planken M, Whelan A, Anisman H, Dossche A, Maes M. (1999). Alterations in immune functions during normal aging and Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 85: 71-80.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7:280-92.
- Spiró Z, Arslan MA, Somogyvári M, Nguyen MT, Smolders A, Dancsó B, Németh N, Elek Z, Braeckman BP, Csermely P, Sőti C. (2012). RNA interference links oxidative stress to the inhibition of heat stress adaptation. *Antioxid Redox Signal.* 17:890–901.
- Squier TC. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol.* 36(9):1539-50.
- Srettabunjong S, Satitsri S, Thongnoppakhun W, Tirawanchai N. (2014). The study on telomere length for age estimation in a Thai population. *Am J Forensic Med Pathol.* 35:148–53.

- Sribanditmongkol V, Neal JL, Patrick TE, Szalacha LA, McCarthy DO. (2015). Effect of perceived stress on cytokine production in healthy college students. *West J Nurs Res.* 37:481-93.
- Stadtman ER. (1992). Protein oxidation and aging. *Science.* 257(5074):1220-4.
- Stanimirovic DB, Friedman A. (2012). Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab.* 32:1207–1221.
- Stout RD, Suttles J. (2005). Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev.* 205: 60-71.
- Strehler BL. (1977). *Time, cells and aging.* NY Academic Press.
- Strindhall J, Nilsson BO, Löfgren S, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B, Wikby A. (2007). No Immune Risk Profile among individuals who reach 100 years of age: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study. *Exp Gerontol.* 42: 753-61.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Smechel D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:1977-1981.
- Sulkava R, Nordberg UR, Erkinjuntti T, Westermarck T. (1986). Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase in Alzheimer's disease and other dementias. *Acta Neurol Scand.* 73:487-9.
- Sultana R, Piroddi M, Galli F, Butterfield DA. (2008). Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res.* 33(12):2540-6.
- Suter M, Richter C. (1999). Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry.* 38(1):459-64.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect in Biol.* 6(10): a016295.
- Tanase M, Urbanska AM, Zolla V, Clement CC, Huang L, Morozova K, Follo C, Goldberg M, Roda B, Reschiglian P, Santambrogio L. (2016). Role of Carbonyl Modifications on Aging-Associated Protein Aggregation. *Sci Rep.* 6:19311.
- Tarazona R, Solana R, Ouyang Q, Pawelec G. (2002). Basic biology and clinical impact of immunosenescence. *Exp Gerontol.* 37: 183-9.
- Tilley L, Morgan K, Kalsheker N. (1998). Genetic risk factors in Alzheimer's disease. *J Clin Pathol.* 51:293-304.

- Toche P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 23 (4): 364-507.
- Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R, Marcourakis T. (2011). Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 26(1):59-68.
- Tortorella C, Piazzolla G, Antonaci S. (2001). Neutrophil oxidative metabolism in aged humans: a perspective. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 23: 565-72.
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Vella F, Pace L, Antonaci S. (2000). Regulatory role of extracellular matrix proteins in neutrophil respiratory burst during aging. *Mech Ageing Dev*. 119(1): 69-82.
- Tsay HJ, Wang P, Wang SL, Ku HH. (2000). Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *J Biomed Sci*. 7(6):466-74.
- Tsikas D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*. 524:13-30.
- Tsukamoto K, Machida K. (2012). Effects of life events and stress on neutrophil functions in elderly men. *Immun Ageing*. 9: 13.
- Unno K, Asakura H, Shibuya Y, Kaiho M, Okada S, Oku N. (2000). Increase in basal level of Hsp70, consisting chiefly of constitutively expressed Hsp70 (Hsc70) in aged rat brain. *J Gerontol Ser A Biol Med Sci*. 55: B329–B335.
- Valenzuela A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci*. 48(4):301-9.
- Van Den Biggelaar AH, Huizinga TW, de Craen AJ, Gussekloo J, Heijmans BT, Frölich M, Westendorp RG. (2004). Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study. *Exp Gerontol*. 39: 1407-14.
- Van Heerebeek L, Meischi C, Stooker W, Meijer CJ, Niessen HW, Roos D. (2002). NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol*. 55(8): 561-8.
- Vasto S, Carruba G, Lio D, Colonna-Romano G, Di Bona D, Candore G, Caruso C. (2009). Inflammation, ageing and cancer. *Mech Ageing Dev*. 130: 40-5.
- Veldhoen M. (2017). Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nature Immunology*. 18: 612–621.

- Ventura MT, Scichilone N, Paganelli R, Minciullo PL, Patella V, Bonini M, Passalacqua G, Lombardi C, Simioni L, Ridolo E, Del Giacco SR, Gangemi S, Canonica GW. (2017). Allergic diseases in the elderly: biological characteristics and main immunological and non-immunological mechanisms. *Clin Mol Allergy*. 15:2.
- Vergallo A, Giampietri L, Baldacci F, Volpi L, Chico L, Pagni C, Giorgi FS, Ceravolo R, Tognoni G, Siciliano G, Bonuccelli U. (2018). Oxidative Stress Assessment in Alzheimer's Disease: A Clinic Setting Study. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 33(1):35-41.
- Vida C, González EM, De la Fuente M. (2014). Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des*. 20(29): 4656- 78.
- Vida C, Martínez de Toda I, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. (2017). Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol*. 12:423–437.
- Vida C, Martínez de Toda I, Garrido A, Carro E, Molina JA, De la Fuente M. (2018). Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Front Immunol*. 8:1974.
- Vida C, Rodríguez-Terés S, Heras V, Corpas I, De la Fuente M, González E. (2011). The aged-related increase in xanthine oxidase expression and activity in several tissues from mice is not shown in long-lived animals. *Biogerontology*. 12(6): 551-564.
- Vida C. (2016). Estudio de la xantina oxidasa y otros parámetros de estado redox en el envejecimiento cronológico, prematuro y patológico en ratón. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Viña J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardó FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, Repine JE. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB life*. 49(6): 539-544.
- Viña J, Lloret A. (2010). Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*. 20: S527-33.
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. (2007). A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation*. 14(3-4): 157-162.
- Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. (2001). Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence. *J Neuroimmunol*. 114(1-2): 80-8.
- Waldmann TA. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev*. 6:595-601.

- Walford RL (1969). The immunologic theory of aging. pp 70-15. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Walston J, Fedarko N, Yang H, Leng S, Beamer B, Espinoza S, Lipton A, Zheng H, Becker K. (2008). The physical and biological characterization of a frail mouse model. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63:391–398.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. (1990). Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J Gerontol.* 45:M45–M48.
- Weissman A. (1891). *Essays upon heredity and kindred biological problems.* London-New York: Oxford University Press-Clarendon.
- Weksler ME. (2000). Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine.* 18: 1624-8.
- Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski P. (2010). Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *Sci World J.* 10: 145-60.
- Whitehead JC, Hildebrand BA, Sun M, Rockwood MR, Rose RA, Rockwood K, Howlett SE. (2014). A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69:621–632.
- Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, Nilsson BO, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B. (2005). An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60(5):556-65.
- Wikby A, Johansson B, Ferguson F, Olsson J. (1994). Age-related changes in immune parameters in a very old population of Swedish people: a longitudinal study. *Exp Gerontol.* 29: 531-41.
- Wikby A, Johansson B, Olsson J, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson F. (2002). Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol.* 37: 445-53.
- Williams GC. (1957). Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution.* 2:397-411.
- Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehydethiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* 33:214-20.
- Xia J, Gravato-Nobre M, Ligoxygakis P. (2019). Convergence of longevity and immunity: lessons from animal models. *Biogerontology.* 20(3):271-278.

-
- Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdalil R, Kalionis B, Wu J, Wan W, Tai X. (2016). An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res.* 2016:8426874.
 - Xiang Z, Haroutunian V, Ho L, Purohit D, Pasinetti GM. (2006). Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. *Dis Markers.* 22(1-2):95-102.
 - Yan H, Harding JJ. (1997). Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J.* 323:599-605.
 - Yancik R, Ries LG. (1991). Cancer in the aged. An epidemiologic perspective on treatment issues. *Cancer.* 68:2502-10.
 - Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *Int Rev Immunol.* 32(3):249-70.
 - Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, Onley D, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK. (1998). Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol.* 44:584–591.
 - Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, Di Pede P, Passeri G, Pedrazzoni M, Passeri M, Franceschi C, Sansoni P. (2003). Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp Gerontol.* 38: 981-7.
 - Zheng Z, Kim JY, Ma H, Lee JE, Yenari MA. (2008). Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28:53–63.
 - Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci.* 64: 2202-10.
 - Zielinski ZA, Pratt DA. (2017). Lipid Peroxidation: Kinetics, Mechanisms, and Products. *J Org Chem.* 82(6):2817-2825.
 - Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 4(6):1247-1253.

9. ANEXO I

ABREVIATURAS

8-OHdG	8-oxo-2'-desoxiguanosina. Derivado oxidado de la desoxiguanosina.
A	Adrenalina.
ACh	Acetilcolina.
ACTH	Hormona adrenocorticotropa.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AGEs	Productos de glicosilación avanzada (del inglés, " <i>Advanced Glycated End-products</i> ").
AICD	Muerte celular inducida por activación (del inglés, " <i>Activation-Induced Cell Death</i> ").
ApoE	Gen que codifica para la apolipoproteína E.
APP	Proteína precursora amiloide.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosín trifosfato.
BCR	Receptor específico de los linfocitos B.
BEP	β -endorfinas.
CA	Catecolaminas.
CAT	Enzima catalasa.
CD	Complejo de diferenciación (del inglés, " <i>Cluster of Differentiation</i> ").
CDR	Valoración clínica de demencia (del inglés, " <i>Clinical Dementia Rating</i> ").
Con A	Concanavalina A.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
cpm	Cuentas por minuto.
DAG	Diacilglicerol.
DAMPs	Patrones moleculares de daño (del inglés, " <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> ").
DCL	Deterioro cognitivo leve.
DHEA	Hormona dehidroepiandrosterona.
DHEA-S	Hormona dehidroepiandrosterona, forma sulfurada.
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEP	Escala de Estrés Percibido.
E-NPAM	Ratones no prematuramente envejecidos excepcionales (del inglés, " <i>Exceptional Non-Prematurely Aging Mice</i> ").
fMLP	Péptido formilado (N-formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina).

GC	Glucocorticoides.
GH	Hormona del crecimiento (del inglés, " <i>Growth Hormone</i> ").
GPx	Enzima glutatión peroxidasa.
GR	Enzima glutatión reductasa.
GSH	Glutatión reducido.
GSSG	Glutatión disulfuro o glutatión oxidado.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.
Hsc70	Proteína de choque térmico expresada constitutivamente.
HSF-1	Factor de transcripción Heat shock factor-1.
Hsp70	Proteína de choque térmico inducible.
IFN	Interferón.
IL	Interlequina.
ILC	Células linfoides innatas (del inglés, " <i>Innate Lymphoid Cells</i> ").
IP ₃	Inosito trifosfato.
IRP	Fenotipo de riesgo inmunitario (del inglés, " <i>Immune Risk Phenotype</i> ").
LCR	Líquido cefalorraquídeo.
LPS	Lipopolisacárido (de la membrana de <i>E. Coli</i>).
MDA	Malondialdehído.
MMSE	Examen cognoscitivo Mini Mental (del inglés, " <i>Mini Mental Scale Examination</i> ").
NA	Noradrenalina.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida.
NBT	Nitroazul de tetrazolio (del inglés, " <i>Nitroblue tetrazolium</i> ").
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B.
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
Nox	NADPH-oxidasa.
NPAM	Ratones no prematuramente envejecidos (del inglés, " <i>Non-Prematurely Aging Mice</i> ").
NPY	Neuropéptido Y.
O ₂ ⁻	Anión superóxido.
O ₂	Oxígeno molecular.
OH ⁻	Radical hidroxilo.

PAM	Ratones envejecidos prematuramente (del inglés, " <i>Prematurely Aging Mice</i> ").
PCR	Proteína C reactiva.
PGE2	Prostaglandina 2.
PHA	Fitohematoglutina.
PLC	Fosfolipasa C.
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, " <i>Pattern Recognition Receptors</i> ").
PSEN1	Presenilina 1.
PSEN2	Presenilina 2
PSS	Escala de estrés percibido (del inglés, " <i>Perceived Scale Stress</i> ").
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados (del inglés, " <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> ").
R-NPAM	Ratones no prematuramente envejecidos comunes (del inglés, " <i>Regular Non-Prematurely Aging Mice</i> ").
RNS	Especies reactivas del nitrógeno.
ROS	Especies reactivas del oxígeno.
SAM	Eje simpático-adreno-medular.
SOD	Enzima superóxido dismutasa.
TCR	Receptor específico de los linfocitos T.
Th	Linfocito T helper o cooperador.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa (del inglés, " <i>Tumor necrosis factor-alfa</i> ").
β A	Péptido β -amiloide.

ESCALA DE ESTRÉS PERCIBIDO (PSS: Perceived Scale Stress)

Las preguntas en esta escala hacen referencia a sus sentimientos y pensamientos durante el **último mes**. En cada caso, por favor indique con una "X" cómo usted se ha sentido o ha pensado en cada situación.

	Nunca	Casi nunca	De vez en cuando	A menudo	Muy a menudo
1. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado afectado por algo que ha ocurrido inesperadamente?	0	1	2	3	4
2. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido incapaz de controlar las cosas importantes en su vida?	0	1	2	3	4
3. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido nervioso o estresado?	0	1	2	3	4
4. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado seguro sobre su capacidad para manejar sus problemas personales?	0	1	2	3	4
5. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las cosas le van bien?	0	1	2	3	4
6. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que no podía afrontar todas las cosas que tenía que hacer?	0	1	2	3	4
7. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha podido controlar las dificultades de su vida?	0	1	2	3	4
8. En el último mes, ¿con qué frecuencia se ha sentido que tenía todo bajo control?	0	1	2	3	4
9. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha estado enfadado porque las cosas que le han ocurrido estaban fuera de su control?	0	1	2	3	4
10. En el último mes, ¿con qué frecuencia ha sentido que las dificultades se acumulan tanto que no puede superarlas?	0	1	2	3	4

Escala de Estrés Percibido (PSS)

Esta escala es un instrumento de auto informe que evalúa el nivel de estrés percibido durante el último mes, consta de 10 ítems con un formato de respuesta de una escala de cinco puntos (0 = nunca, 1 = casi nunca, 2 = de vez en cuando, 3 = a menudo, 4 = muy a menudo). La puntuación total de la PSS se obtiene invirtiendo las puntuaciones de los ítems 4, 5, 7 y 8 (en el sentido siguiente: 0=4, 1=3, 2=2, 3=1 y 4=0) y sumando entonces los 10 ítems. La puntuación directa obtenida indica que a una mayor puntuación corresponde un mayor nivel de estrés percibido.

Basado en Folstein et al. (1975), Lobo et al. (1979)

Varón [] Mujer []

Edad:

 $N.H^a:$

Observaciones:

¿En qué año estamos? 0-1 ¿En qué estación? 0-1 ¿En qué día (fecha)? 0-1 ¿En qué mes? 0-1 ¿En qué día de la semana? 0-1		ORIENTACIÓN TEMPORAL (Máx.5)	
¿En qué hospital (o lugar) estamos? 0-1 ¿En qué piso (o planta, sala, servicio)? 0-1 ¿En qué pueblo (ciudad)? 0-1 ¿En qué provincia estamos? 0-1 ¿En qué país (o nación, autonomía)? 0-1		ORIENTACIÓN ESPACIAL (Máx.5)	
Nombre tres palabras Peseta-Caballo-Manzana (o Balón- Bandera-Arbol) a razón de 1 por segundo. Luego se pide al paciente que las repita. Esta primera repetición otorga la puntuación. Otorgue 1 punto por cada palabra correcta, pero continúe diciéndolas hasta que el sujeto repita las 3, hasta un máximo de 6 veces. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)		Nº de repeticiones necesarias FLIJACIÓN-Recuerdo Inmediato (Máx.3)	
Si tiene 30 pesetas y me va dando de tres en tres, ¿Cuántas le van quedando?. Detenga la prueba tras 5 sustracciones. Si el sujeto no puede realizar esta prueba, pídale que deletree la palabra MUNDO al revés. 30 0-1 27 0-1 24 0-1 21 0-1 18 0-1 (O 0-1 D 0-1 N 0-1 U 0-1 M0-1)		ATENCIÓN- CÁLCULO (Máx.5)	
Preguntar por las tres palabras mencionadas anteriormente. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)		RECUERDO diferido (Máx.3)	
.DENOMINACIÓN. Mostrarle un lápiz o un bolígrafo y preguntar ¿qué es esto?. Hacer lo mismo con un reloj de pulsera. Lápiz 0-1 Reloj 0-1 .REPETICIÓN. Pedirle que repita la frase: "ni sí, ni no, ni pero" (o "En un trigal había 5 perros") 0-1 .ÓRDENES. Pedirle que siga la orden: "coja un papel con la mano derecha, dóblelo por la mitad, y póngalo en el suelo". Coje con mano d. 0-1 dobla por mitad 0-1 pone en suelo 0-1 .LECTURA. Escriba legiblemente en un papel "Cierre los ojos". Pídale que lo lea y haga lo que dice la frase 0-1 .ESCRITURA. Que escriba una frase (con sujeto y predicado) 0-1 .COPIA. Dibuje 2 pentágonos intersectados y pida al sujeto que los copie tal cual. Para otorgar un punto deben estar presentes los 10 ángulos y la intersección. 0-1		LENGUAJE (Máx.9)	
Puntuaciones de referencia 27 ó más: normal 24 ó menos: sospecha patológica 12-24: deterioro 9-12 : demencia		Puntuación Total (Máx.: 30 puntos)	

323

VALORACIÓN CLÍNICA DE DEMENCIA (CDR: Clinical Dementia Rating)

Valoración Clínica de Demencia[®] (Spanish version of CDR)

Valoración Clínica de Demencia (CDR)	0	0.5	1	2	3
--------------------------------------	---	-----	---	---	---

	Deterioro				
	Ninguno 0	Dudoso 0.5	Leve 1	Moderado 2	Grave 3
Memoria	Sin pérdida de memoria o leves olvidos inconstantes	Olvidos leves constantes; recolección parcial de eventos; olvidos "benignos"	Pérdida moderada de memoria; más marcada para eventos recientes; el defecto interfiere con las actividades diarias	Pérdida grave de memoria; sólo retiene materias con mucho aprendizaje; materias nuevas se pierden con rapidez	Pérdida grave de memoria; sólo retiene fragmentos
Orientación	Completamente orientado	Completamente orientado pero con leve dificultad para las relaciones temporales	Dificultad moderada con las relaciones temporales; orientado en el lugar del examen; puede tener algo de desorientación geográfica en otro lugar	Dificultad grave con las relaciones temporales; habitualmente desorientado en el tiempo; a menudo en el lugar	Orientado sólo en persona
Razonamiento y solución de problemas	Resuelve los problemas diarios y se encarga bien de los negocios y finanzas; razonamiento bueno con relación al comportamiento previo	Leve dificultad para resolver problemas, similitudes y diferencias	Dificultad moderada para hacer frente a problemas, similitudes y diferencias; razonamiento social habitual mantenido	Grandes dificultades para hacer frente a problemas, similitudes y diferencias; juicio social habitual limitado	Incapaz de razonar o resolver problemas
Actividades fuera de casa	Función independiente a su nivel habitual en el trabajo, compras, voluntariado y agrupaciones sociales	Leve dificultad en estas actividades	Incapaz de ser independiente en estas actividades, aunque aún puede participar en alguna; parece normal a primera vista	Incapaz de ser independiente fuera de casa Parece estar lo suficientemente bien como para realizar funciones fuera de casa	
Actividades domésticas y aficiones	Vida en casa, aficiones e intereses intelectuales bien conservados	Vida en casa, aficiones e intereses intelectuales algo limitados	Dificultad leve pero clara de su actividad doméstica; abandono de las tareas más difíciles; abandono de las aficiones e intereses más complicados	Sólo realiza tareas simples; intereses muy restringidos y mal mantenidos	Sin función significativa en casa
Cuidado personal	Completamente capaz de cuidarse por sí mismo/a		Necesita recordatorios	Requiere ayuda para vestirse, aseo y encargarse de sus efectos personales	Requiere mucha ayuda para su cuidado personal; incontinencia frecuente

Puntúe sólo cuando disminuya del nivel previo habitual debido a pérdida cognitiva, no a limitaciones debidas a otros factores.

Se asigna a cada ítem (memoria, orientación...) la puntuación que le corresponda (0, 0.5, 1, 2 o 3) de acuerdo con la del grado CDR que mejor encaje con el estado clínico del paciente.

La afectación del área «memoria» tiene prioridad para determinar el estadio general. Así, si al menos otras tres áreas son calificadas con la misma puntuación que la memoria, el grado de afectación de esta es el que define el estadio general. Sin embargo, si más de tres categorías se gradúan por encima o por debajo de la calificación de la memoria, entonces predomina la puntuación de aquellas.

La puntuación se expresa mediante el valor que resulte representativo según lo explicado en los párrafos anteriores: «CDR 2», por ejemplo, que se correspondería con una demencia en estadio moderado.

10. ANEXO II

A continuación, se enumera la relación de otras publicaciones relacionadas con la presente tesis:

1. Demirovic D, **Martínez de Toda I**, Nizard C, Rattan SIS. (2014). Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. *J Cell Commun Signal*. 8(4):333-9.
2. Demirovic D, **Martínez de Toda I**, Rattan SIS. (2014). Molecular stress response pathways as the basis of hormesis. In: *Hormesis in Health and Disease*. pp. 227 - 242. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
3. **Martínez de Toda I**, De La Fuente M. (2015). The role of Hsp70 in oxi-inflamm-aging and its use as a potential biomarker of lifespan. *Biogerontology*. 16(6):709-21.
4. Ardura JA, Portal-Núñez S, Castelbón-Calvo I, **Martínez de Toda I**, De La Fuente M, Esbrit P. (2016). Parathyroid hormone-related protein protects osteoblastic cells from oxidative stress by activation of MKP1 phosphatase. *J Cell Physiol*. 232(4): 785-796.
5. Vida C, **Martínez de Toda I**, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. (2017). Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol*. 12:423-437.
6. Vida C, **Martínez de Toda I**, Garrido A, Carro E, Molina JA, De la Fuente M. (2018). Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Front Immunol*. 8:1974.
7. Portal-Núñez S, Ardura JA, Lozano D, **Martínez de Toda I**, De la Fuente M, Herrero-Beaumont G, Largo R, Esbrit P. (2018). Parathyroid hormone-related protein exhibits antioxidant features in osteoblastic cells through its N-terminal and osteostatin domains. *Bone Joint Res*. 7(1):58-68.
8. Carracedo J, Ramírez-Carracedo R, **Martínez de Toda I**, Vida C, Alique M, De la Fuente M, Ramírez-Chamond R. (2018). Protein Carbamylation: A Marker Reflecting Increased Age-Related Cell Oxidation. *Int J Mol Sci*. 19(5). pii: E1495.
9. Vida C, Kobayashi H, Garrido A, **Martínez de Toda I**, Carro E, Molina JA, De La Fuente M. (2019). Lymphoproliferation Impairment and Oxidative Stress in Blood Cells from Early Parkinson's Disease Patients. *Int J Mol Sci*. 20(3). pii: E771.
10. Hunsche C, **Martínez de Toda I**, De la Fuente M. (2019). Impacts of the late adulthood diet-induced obesity onset on behavior, immune function, redox state and life span of male and female mice. *Brain Behav Immun*. 78:65-77.

